

Family list

Approximately 341 application(s) for: JP6505625 (T)

- 1 Probe groups for the detection of nucleotide variations and genetic polymorphisms.**
Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY ; SAIKI **Applicant:** CETUS CORP [US]
RANDALL KEICHI (+2)
EC: C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3) **IPC:** C07K14/74; C12Q1/68; C07K14/435; (+3)
Publication info: AT73502 (T) — 1992-03-15
- 2 Means for amplifying nucleic acid sequences.**
Inventor: MULLIS KARY BANKS **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
EC: B01L7/00D; C12Q1/68D4 **IPC:** B01L7/00; C12Q1/68; C40B40/06; (+9)
Publication info: AT83505 (T) — 1993-01-15
- 3 Kit for use in amplifying and detecting nucleic acid sequences.**
Inventor: MULLIS KARY BANKS ; ARNHEIM **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
NORMAN (+4)
EC: B01L7/00D; C07K14/805; (+3) **IPC:** B01L7/00; C07K14/805; C12N15/10; (+13)
Publication info: AT84822 (T) — 1993-02-15
- 4 CHARACTERIZATION AND DETECTION OF SEQUENCES ASSOCIATED WITH AUTOIMMUNE DISEASES**
Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; HORN **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
GLENN T [US]
EC: C12Q1/68M6; C07K14/705B28; (+1) **IPC:** G01N33/53; A61K38/00; A61K39/395; (+19)
Publication info: AT106454 (T) — 1994-06-15
- 5 Process for detecting specific nucleotide variations and genetic polymorphisms present in nucleic acids and kits therefor.**
Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY [US] ; **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
SAIKI RANDALL KEICHI [US] (+2)
EC: C07K14/705B28; C12Q1/68B6; (+3) **IPC:** C12N15/09; C07K14/74; C12Q1/68; (+6)
Publication info: AT125307 (T) — 1995-08-15
- 6 Detection of viruses by amplification and hybridization.**
Inventor: SNINSKY JOHN JOSEPH [US] ; KWOK **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
SHIRLEY LEE [US] (+1)
EC: C12Q1/70B6; C12Q1/70; (+1) **IPC:** C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/569; (+7)
Publication info: AT127857 (T) — 1995-09-15
- 7 PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME**
Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; STOFFEL **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
SUSANNE [US] (+2)
EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2) **IPC:** C12N15/09; C11D3/386; C12N1/21; (+15)
Publication info: AT135741 (T) — 1996-04-15
- 8 METHOD FOR HLA DP TYPING**
Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; HORN **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
GLENN T [US] (+2)
EC: C12Q1/68M4 **IPC:** C12N15/09; A61K39/00; A61K49/00; (+14)
Publication info: AT140035 (T) — 1996-07-15
- 9 HIGH TEMPERATURE REVERSE TRANSCRIPTASES**
Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; MYERS **Applicant:** HOFFMANN LA ROCHE [CH]
THOMAS W [US]
EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2) **IPC:** C12N15/09; C12N9/12; C12Q1/68; (+5)
Publication info: AT151112 (T) — 1997-04-15

- 10 Apparatus and method for performing automated amplification of nucleic acid sequences and assays using heating and cooling steps.**
Inventor: JOHNSON LARRY JAMES [US] ; LEATH RICHARD ALAN [US] (+4)
EC: C07H21/00C4; B01J19/00C; (+1) Applicant: PERKIN ELMER CORP [US]
IPC: C12N15/09; B01J19/00; B01L7/00; (+23)
Publication info: AT152529 (T) — 1997-05-15
- 11 Purified thermostable enzyme and process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences using said enzyme.**
Inventor: ERLICH HENRY ANTHONY [US] ; HORN GLENN [US] (+5)
EC: C12P19/34; C12N9/12B7B7; (+1) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N9/12; C12N9/96; C12N15/09; (+14)
Publication info: AT154072 (T) — 1997-06-15
- 12 METHODS AND REAGENTS FOR HLA DRBETA DNA TYPING**
Inventor: ERLICH HENRY A [US] ; BEGOVICH ANN B [US] (+4)
EC: C12Q1/68M4 Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68
Publication info: AT164630 (T) — 1998-04-15
- 13 Process for amplifying nucleic acid sequences.**
Inventor: MULLIS KARY BANKS [US]
EC: C12N15/10; B01L7/00D; (+2) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; B01L7/00; C07K14/805; (+14)
Publication info: AT165869 (T) — 1998-05-15
- 14 RECOMBINANT EXPRESSION VECTORS AND PURIFICATION METHODS FOR THERMUS THERMOPHILUS DNA POLYMERASE**
Inventor: GELFAND DAVID H [US] ; LAWYER FRANCES C [US] (+1)
EC: C12N9/12B7B7; C12N9/12B7B49; (+2) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N15/09; C07H21/04; C12N1/21; (+16)
Publication info: AT169337 (T) — 1998-08-15
- 15 THE REDUCTION OF NON-SPECIFIC AMPLIFICATION DURING IN VITRO NUCLEIC ACID AMPLIFICATION USING MODIFIED NUCLEIC ACID BASES**
Inventor: SNINSKY JOHN J [US] ; GELFAND DAVID H [US] (+1)
EC: C12N9/12B7B49; C12Q1/68D2A; (+1) Applicant: HOFFMANN LA ROCHE [CH]
IPC: C12N9/00; C12N9/12; C12N15/09; (+10)
Publication info: AT176002 (T) — 1999-02-15

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-505625

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)6月30日

(51) Int. Cl.⁴

C12Q 1/68

識別記号

庁内整理番号

F I

A 7823-4B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願平4-502862
(86) (22) 出願日 平成3年(1991)12月6日
(85) 翻訳文提出日 平成4年(1992)8月6日
(86) 国際出願番号 PCT/US91/09294
(87) 国際公開番号 WO92/10589
(87) 国際公開日 平成4年(1992)6月25日
(31) 優先権主張番号 623,098
(32) 優先日 1990年12月6日
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N L, SE), AU, CA, JP, US

(71) 出願人 エフ. ホフマン - ラ ロシュ アーゲ
スイス国シーエイチ-4002 バーゼル グ
レンツァーヘルストラッセ 124
(72) 発明者 アーリッヒ, ヘンリー エイ.
アメリカ合衆国94602 カリフォルニア州
オークランド, ローダ アベニュー 3936
(72) 発明者 ベゴビッチ, アン ビー.
アメリカ合衆国94350 カリフォルニア州
エル セリト, ロックウェイ アベニュー
7306
(74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

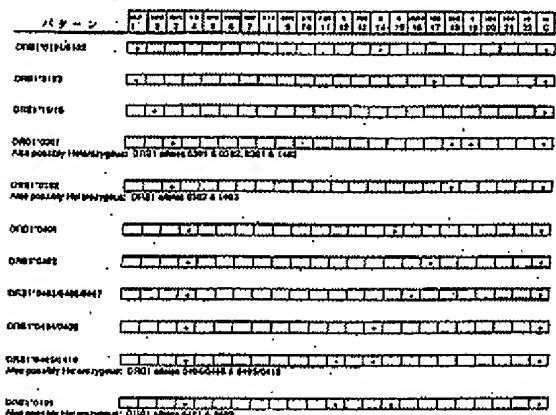
(54) 【発明の名称】 HLA DRβのDNAタイピングのための方法および試薬

(57) 【要約】

HLA DRβ遺伝子第二エクソンの特異的核酸配列の増幅用プライマーおよびその増幅されたDNA中に含有される多形配列の同定用プローブを、様々な起源のホモ接合体またはヘテロ接合体サンプルの型の判定および血清学的方法では識別できない対立遺伝子変異体の検出に使用できる。このHLA DRβ DNAの型判定システムは、実施が迅速かつ簡便で、分単位で検出可能なシグナルを生成するドットプロットフォーマットに使用でき、組織の型の判定、固体の同一性の決定、および疾患への感受性の同定に応用できる。

DRβ1 タイプパターン

アロップ



請求の範囲

1. サンプル中の核酸のDRB DNA型を決定するための方法において、
 - (a) DRB遺伝子第二エクソンを含有するサンプル中の任意の核酸を増幅し、
 - (b) 工程(a)で増幅された上記核酸を第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせ、
 - (c) DRB遺伝子第二エクソンの配列を含有するサンプル中の核酸の特定のサブセットを増幅し、
 - (d) 工程(c)で増幅された上記核酸を第二のパネルのオリゴヌクレオチドプローブとこれらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせ、ついで
 - (e) 工程(b)および(d)におけるプローブハイブリダイゼーションのパターンからサンプル中のDRB DNAの由来するDRB遺伝子型を決定する、

工程からなる方法

2. 工程(a)および(c)の増幅は、一対のオリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応によって行い、工程(a)において用いられるプライマー対は工程(c)において用いられるプライマー対とは異なる「請求項1」記載の方法

3. 工程(a)において用いられるプライマーは GH48 および GH50 であり、工程(c)において用いられるプライマーは GH48 および CRX37 または GH48 および CR830のいずれかである「請求項2」記載の方法

4. オリゴヌクレオチドプローブの第一および第二のパネルはそれぞれ2種または2種以上のプローブからなり、これらのプローブはDRB遺伝子第二エクソン配列にハイブリダイスし、これらの配列はアミノ酸残基9~16、アミノ酸残基25~34、アミノ酸残基67~74、およびアミノ酸残基88をコードする配列からなる群より選ばれる「請求項1」記載の方法

5. オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルは、プローブ CRX80 (SEQ ID NO:79)、GH105 (SEQ ID NO:91)、GH104 (SEQ ID NO:80)、GH50 (SEQ ID NO:57)、CRX08 (SEQ ID NO:61)、GH122 (SEQ ID NO:93)、CRX23 (SEQ ID NO:68)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX48 (SEQ ID NO:74)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH111 (SEQ ID NO:92)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX68 (SEQ ID NO:84)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項9」記載のキット

6. オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルは、プローブ GH125 (SEQ ID NO:94)、CRX50 (SEQ ID NO:69)、CRX53 (SEQ ID NO:76)、CRX16 (SEQ ID NO:84)、CRX82 (SEQ ID NO:81)、CRX69 (SEQ ID NO:82)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、GH54 (SEQ ID NO:85)、CRX58 (SEQ ID NO:77)、CRX57 (SEQ ID NO:78)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項9」記載のキット

11. プライマー GH48 (SEQ ID NO:67)、GH50 (SEQ ID NO:58)、および CRX37 (SEQ ID NO:73)、プローブ CRX80 (SEQ ID NO:79)、GH105 (SEQ ID NO:91)、GH104 (SEQ ID NO:80)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX08 (SEQ ID NO:61)、GH122 (SEQ ID NO:93)、CRX23 (SEQ ID NO:68)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX48 (SEQ ID NO:74)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH111 (SEQ ID NO:92)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX68 (SEQ ID NO:84)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブ、ならびにプローブ GH125 (SEQ ID NO:94)、CRX50 (SEQ ID NO:69)、CRX53 (SEQ ID NO:76)、CRX16 (SEQ ID NO:84)、CRX82 (SEQ ID NO:81)、CRX69 (SEQ ID NO:82)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、GH54 (SEQ ID NO:85)、CRX58 (SEQ ID NO:77)、CRX57 (SEQ ID NO:78)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる第二のパネルのオリゴヌクレオチドプローブからなる「請求項10」記載のキット

12. サンプルが DR1、DR2、DR4、DR7、DR9、および DR10タイプからなる群より選ばれる血漿型のDRB1対立遺伝子からの核酸からなるか否かを決定する方法において、

- (a) サンプル中のDRB1核酸を増幅し、ついで
- (b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせ、この場合上記プローブはDRB1遺伝子第二エクソンのアミノ酸残基9~16をコードする特定の多形配列にハイブリ

- 71)、CRX48 (SEQ ID NO:74)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH111 (SEQ ID NO:92)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX68 (SEQ ID NO:84)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項4」記載の方法

6. オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルは、プローブ GH125 (SEQ ID NO:94)、CRX50 (SEQ ID NO:69)、CRX53 (SEQ ID NO:76)、CRX16 (SEQ ID NO:84)、CRX82 (SEQ ID NO:81)、CRX69 (SEQ ID NO:82)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、GH54 (SEQ ID NO:85)、CRX58 (SEQ ID NO:77)、CRX57 (SEQ ID NO:78)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項4」記載の方法

7. 工程(a)において用いられるプライマーは GH48 (SEQ ID NO:67) および GH50 (SEQ ID NO:58) であり、工程(c)において用いられるプライマーは GH48 および CRX37 (SEQ ID NO:73) であり、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブ CRX80 (SEQ ID NO:79)、GH105 (SEQ ID NO:91)、GH104 (SEQ ID NO:80)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX08 (SEQ ID NO:61)、GH122 (SEQ ID NO:93)、CRX23 (SEQ ID NO:68)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX48 (SEQ ID NO:74)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH111 (SEQ ID NO:92)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX68 (SEQ ID NO:84)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなり、オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルは、プローブ GH125 (SEQ ID NO:94)、CRX50 (SEQ ID NO:69)、CRX53 (SEQ ID NO:76)、CRX16 (SEQ ID NO:84)、CRX82 (SEQ ID NO:81)、CRX69 (SEQ ID NO:82)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、GH54 (SEQ ID NO:85)、CRX58 (SEQ ID NO:77)、CRX57 (SEQ ID NO:78)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる「請求項4」記載の方法

8. オリゴヌクレオチドプローブの第一および第二のパネルは固体支持体に固定し、各プローブは上記支持体上の分離した別々の位置に配置させる「請求項1」記載の方法

9. 工程(a)および工程(c)において用いられるプライマー、ならびにオリゴヌクレオチドプローブの第一および第二のパネルからなる「請求項2」記載の方法を実施するためのキット

10. プライマー GH48 (SEQ ID NO:67)、GH50 (SEQ ID NO:58)、および CRX37

リダイスする方法

13. 増幅工程はプライマーGH48およびGH50とのポリメラーゼ連鎖反応によって行い、プローブのパネルは CRX80 (SEQ ID NO:79)、GH105 (SEQ ID NO:91)、GH104 (SEQ ID NO:80)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX08 (SEQ ID NO:61)、GH122 (SEQ ID NO:93)、CRX23 (SEQ ID NO:68)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX48 (SEQ ID NO:74)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH111 (SEQ ID NO:92)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX04 (SEQ ID NO:60)、GH56 (SEQ ID NO:86)、CRX68 (SEQ ID NO:84)、および CRX12 (SEQ ID NO:83) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項12」記載の方法

14. サンプルが対立遺伝子0101、0102、0103、0301、0302、0401、0402、0403、0404、0405、0408、0407、0408、0701、0801、0802、0803、0901、1001、1101、1102、1103、1104、1201、1301、1302、1303、1401、1402、DR2、DR*PEY からなる群より選ばれるDRB1対立遺伝子からの核酸を含有するカガキを決定し、その核酸が由来する対立遺伝子を決定する方法において、

- (a) サンプル中のDRB1核酸を増幅し、ついで
- (b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせる方法

15. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブ CRX04 (SEQ ID NO:60)、CRX08 (SEQ ID NO:61)、CRX16 (SEQ ID NO:84)、CRX23 (SEQ ID NO:68)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX48 (SEQ ID NO:74)、CRX50 (SEQ ID NO:69)、CRX53 (SEQ ID NO:76)、CRX68 (SEQ ID NO:77)、CRX67 (SEQ ID NO:78)、CRX80 (SEQ ID NO:79)、CRX81 (SEQ ID NO:80)、CRX82 (SEQ ID NO:81)、CRX63 (SEQ ID NO:82)、CRX68 (SEQ ID NO:84)、GH54 (SEQ ID NO:85)、GH56 (SEQ ID NO:86)、GH59 (SEQ ID NO:87)、GH102 (SEQ ID NO:89)、GH105 (SEQ ID NO:91)、GH111 (SEQ ID NO:92)、GH122 (SEQ ID NO:93)、および GH125 (SEQ ID NO:94) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項14」記載の方法

16. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブ CRX04 (SEQ ID NO:60)、CRX08 (SEQ ID NO:61)、CRX16 (SEQ ID NO:84)、CRX23 (SEQ ID NO:68)、CRX34 (SEQ ID NO:70)、CRX35 (SEQ ID NO:71)、CRX48 (SEQ ID NO:74)、CRX50 (SEQ ID NO:69)、CRX53

(SEQ ID NO:78), CRX56 (SEQ ID NO:77), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX80 (SEQ ID NO:79), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX82 (SEQ ID NO:81), CRX83 (SEQ ID NO:82), CRX88 (SEQ ID NO:84), GH54 (SEQ ID NO:85), GH58 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), GH122 (SEQ ID NO:93), および GH125 (SEQ ID NO:94) からなる「請求項15」記載の方法

17. サンプルの血清分画が CR10w1, DR10w1, DR2, DR40w4, DR40w10, DR40w13, DR40w14, DR40w15, DR3, DRw11, DRw8, DRw11.1, DRw11.2, DRw12, DRw8.3, DRw13, DRw14, DRw14w8, DR7, DRw8.2, DRw8.2.083, および DRw10タイプからなる群より選ばれるその血清分画型を決定する方法において、

(a) サンプル中のCR81核酸を増幅し、ついで

(b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせる方法

18. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04 (SEQ ID NO:60), CRX05 (SEQ ID NO:61), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX49 (SEQ ID NO:74), CRX63 (SEQ ID NO:78), CRX83 (SEQ ID NO:79), CRX83 (SEQ ID NO:82), GH58 (SEQ ID NO:86), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), および GH122 (SEQ ID NO:93) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項17」記載の方法

19. オリゴヌクレオチドプローブのパネルは、プローブCRX04 (SEQ ID NO:60), CRX05 (SEQ ID NO:61), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX34 (SEQ ID NO:70), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX49 (SEQ ID NO:74), CRX63 (SEQ ID NO:78), CRX80 (SEQ ID NO:79), CRX83 (SEQ ID NO:82), GH58 (SEQ ID NO:86), GH59 (SEQ ID NO:87), GH102 (SEQ ID NO:89), GH105 (SEQ ID NO:91), GH111 (SEQ ID NO:92), および GH122 (SEQ ID NO:93) からなる群よりなる「請求項18」記載の方法

20. A854 (SEQ ID NO:81), A882 (SEQ ID NO:84), A883 (SEQ ID NO:85), B8258 (SEQ ID NO:85), B8260 (SEQ ID NO:86), DR817 (SEQ ID NO:78), DR830 (SEQ ID NO:107), DR8182 (SEQ ID NO:228), CRX11 (SEQ ID NO:62), および CRX37 (SEQ ID NO:73) からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドプライマー

ID NO:144), DR8203 (SEQ ID NO:278), DR8183 (SEQ ID NO:239), DR8118 (SEQ ID NO:194), DR802 (SEQ ID NO:81), DR838 (SEQ ID NO:116), DR8222 (SEQ ID NO:288), DR8232 (SEQ ID NO:308), DR8138 (SEQ ID NO:212), DR8198 (SEQ ID NO:274), および DR842 (SEQ ID NO:119) からなる「請求項2」記載の方法

25. サンプルが対立遺伝子0101, 0102, 0103, 1501, 1502, 1503, 1504, 1501, 1502, 0301, 0302, 0303, 0401, 0402, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0409, 0410, 04011, 1101, 1102, 1103, 1104, 8105, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305, 1401, 1402, 1403, 1405, 0701, 0801, 0802, 0803, 0804, 0901, 1001, 1201, および1202からなる群より選ばれるDR81対立遺伝子からの核酸を含有するか否かを決定し、その核酸が由来する対立遺伝子を決定する方法において、

(a) サンプル中のDR81核酸を増幅し、ついで

(b) 工程(a)で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイスするような条件下にハイブリダイスさせる方法

26. 第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブは、CRX33 (SEQ ID NO:69), GH104 (SEQ ID NO:80), GH66 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), CRX49 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX68 (SEQ ID NO:84), CRX82 (SEQ ID NO:81) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

27. 第二のプローブのパネルは第三のプローブのパネルから選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなり、第三のパネルはパネルGH104 (SEQ ID NO:80), DR863 (SEQ ID NO:140), DR8113 (SEQ ID NO:189), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), DR8186 (SEQ ID NO:272), DR8197 (SEQ ID NO:273), DR8215 (SEQ ID NO:291), および DR8216 (SEQ ID NO:282), CRX60 (SEQ ID NO:75), GH125 (SEQ ID NO:94), DR8180 (SEQ ID NO:258), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX69 (SEQ ID NO:84), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), および GH58 (SEQ ID NO:86), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX84 (SEQ ID NO:83), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX15 (SEQ ID NO:64),

21. DR818 (SEQ ID NO:87), DR820 (SEQ ID NO:88), DR821 (SEQ ID NO:89), DR827 (SEQ ID NO:106), DR831 (SEQ ID NO:108), DR832 (SEQ ID NO:109), DR833 (SEQ ID NO:110), DR834 (SEQ ID NO:111), DR835 (SEQ ID NO:112), DR838 (SEQ ID NO:113), DR837 (SEQ ID NO:114), DR842 (SEQ ID NO:119), DR845 (SEQ ID NO:122), DR848 (SEQ ID NO:123), DR848 (SEQ ID NO:125), DR860 (SEQ ID NO:148), DR884 (SEQ ID NO:160), DR890 (SEQ ID NO:186), DR891 (SEQ ID NO:187), DR895 (SEQ ID NO:171), DR8100 (SEQ ID NO:176), DR8101 (SEQ ID NO:177), DR8102 (SEQ ID NO:178), DR8103 (SEQ ID NO:179), DR8107 (SEQ ID NO:183), DR8108 (SEQ ID NO:184), DR8109 (SEQ ID NO:185), DR8112 (SEQ ID NO:188), DR8113 (SEQ ID NO:189), および DR8118 (SEQ ID NO:184) からなる群より選ばれるオリゴヌクレオチドプローブ

22. 第一のパネルのプローブは、DR801 (SEQ ID NO:76), GH104 (SEQ ID NO:80), DR848 (SEQ ID NO:123), DR848 (SEQ ID NO:125), DR8207 (SEQ ID NO:283), GH102 (SEQ ID NO:89), DR8208 (SEQ ID NO:285), DR820 (SEQ ID NO:88), DR8102 (SEQ ID NO:178), DR8112 (SEQ ID NO:188), DR807 (SEQ ID NO:84), および DR842 (SEQ ID NO:119) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

23. 第二のパネルのプローブは、DR8223 (SEQ ID NO:229), DR837 (SEQ ID NO:144), DR8203 (SEQ ID NO:278), DR8183 (SEQ ID NO:239), DR8118 (SEQ ID NO:194), DR802 (SEQ ID NO:81), DR838 (SEQ ID NO:116), DR8222 (SEQ ID NO:288), DR8232 (SEQ ID NO:308), DR8138 (SEQ ID NO:212), DR8198 (SEQ ID NO:274), および DR842 (SEQ ID NO:119) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなる「請求項1」記載の方法

24. 工程(a)において用いられるプライマーは CRX28 (SEQ ID NO:87) および CRX29 (SEQ ID NO:88) であり、工程(c)において用いられるプライマーは CRX28 および CRX37 (SEQ ID NO:73) であり、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブDR801 (SEQ ID NO:76), GH104 (SEQ ID NO:80), DR848 (SEQ ID NO:123), DR848 (SEQ ID NO:125), DR8207 (SEQ ID NO:283), GH102 (SEQ ID NO:89), DR8208 (SEQ ID NO:285), DR820 (SEQ ID NO:88), DR8102 (SEQ ID NO:178), DR8112 (SEQ ID NO:188), DR807 (SEQ ID NO:84), および DR842 (SEQ ID NO:119) からなり、オリゴヌクレオチドプローブの第二のパネルはプローブDR8223 (SEQ ID NO:229), DR837 (SEQ

CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), GH58 (SEQ ID NO:87), および CRX33 (SEQ ID NO:69), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX06 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), DR8181 (SEQ ID NO:257), CRX68 (SEQ ID NO:77), GH102 (SEQ ID NO:89), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項1」記載の方法

28. 工程(a)において用いられるプライマーは GH48 (SEQ ID NO:87) および GH50 (SEQ ID NO:88) であり、工程(c)において用いられるプライマーは A883 (SEQ ID NO:83) と A880 (SEQ ID NO:67), A882 (SEQ ID NO:84) と A880, A854 (SEQ ID NO:66) と A880, および GH48 (SEQ ID NO:87) と CRX37 (SEQ ID NO:73) からなる群より選ばれる、オリゴヌクレオチドプローブの第一のパネルはプローブCRX33 (SEQ ID NO:69), GH104 (SEQ ID NO:80), GH58 (SEQ ID NO:88), GH59 (SEQ ID NO:87), CRX49 (SEQ ID NO:74), GH102 (SEQ ID NO:89), GH111 (SEQ ID NO:92), CRX34 (SEQ ID NO:70), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX68 (SEQ ID NO:84), および CRX82 (SEQ ID NO:81) からなる群より選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなり、第二のプローブのパネルは第三のプローブのパネルから選ばれる2種またはそれ以上のプローブからなり、第三のパネルはパネルGH104 (SEQ ID NO:80), DR863 (SEQ ID NO:140), DR8113 (SEQ ID NO:189), CRX35 (SEQ ID NO:71), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), DR8196 (SEQ ID NO:272), DR8197 (SEQ ID NO:273), DR8215 (SEQ ID NO:291), および DR8216 (SEQ ID NO:282), CRX60 (SEQ ID NO:75), GH125 (SEQ ID NO:94), DR8180 (SEQ ID NO:258), GH122 (SEQ ID NO:93), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), GH58 (SEQ ID NO:87), CRX61 (SEQ ID NO:80), CRX23 (SEQ ID NO:66), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX62 (SEQ ID NO:81), CRX68 (SEQ ID NO:84), CRX36 (SEQ ID NO:71), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX57 (SEQ ID NO:78), CRX58 (SEQ ID NO:77), および GH58 (SEQ ID NO:86), CRX81 (SEQ ID NO:80), CRX84 (SEQ ID NO:83), CRX04 (SEQ ID NO:60), CRX15 (SEQ ID NO:64), CRX08 (SEQ ID NO:61), CRX57 (SEQ ID NO:78), DR8181 (SEQ ID NO:257), CRX58 (SEQ ID NO:77), GH102 (SEQ ID NO:89), GH54 (SEQ ID NO:85), CRX63 (SEQ ID NO:82), CRX35 (SEQ ID NO:71) からなる群より選ばれる「請求項2」記載の方法

29. 工程 (a) において用いられるプライマーはGH48 (SEQ ID NO: 67) およびGH50 (SEQ ID NO: 68) であり、工程 (c) において用いられるプライマーはA893 (SEQ ID NO: 69) とA890 (SEQ ID NO: 67)、A892 (SEQ ID NO: 68) とA890、A894 (SEQ ID NO: 68) とA890、およびGH48 (SEQ ID NO: 67) とCRX37 (SEQ ID NO: 73) からなる群より選ばれ、オリゴヌクレオチドプローブの第一のペネルはプローブCRX33 (SEQ ID NO: 69)、GH104 (SEQ ID NO: 69)、GH68 (SEQ ID NO: 69)、GH59 (SEQ ID NO: 67)、CRX49 (SEQ ID NO: 74)、GH102 (SEQ ID NO: 69)、GH111 (SEQ ID NO: 62)、CRX34 (SEQ ID NO: 70)、GH122 (SEQ ID NO: 93)、CRX81 (SEQ ID NO: 80)、CRX23 (SEQ ID NO: 88)、CRX08 (SEQ ID NO: 81)、CRX35 (SEQ ID NO: 71)、CRX08 (SEQ ID NO: 84)、およびCRX82 (SEQ ID NO: 81) からなり、第二のペネルはペネルGH104 (SEQ ID NO: 90)、DRB83 (SEQ ID NO: 140)、DRB119 (SEQ ID NO: 189)、CRX35 (SEQ ID NO: 71)、CRX67 (SEQ ID NO: 78)、CRX68 (SEQ ID NO: 77)、DRB198 (SEQ ID NO: 272)、DRB197 (SEQ ID NO: 273)、DRB215 (SEQ ID NO: 297)、およびDRB216 (SEQ ID NO: 292)、CRX50 (SEQ ID NO: 76)、GH125 (SEQ ID NO: 94)、DRB180 (SEQ ID NO: 258)、GH122 (SEQ ID NO: 83)、CRX81 (SEQ ID NO: 80)、CRX23 (SEQ ID NO: 86)、CRX06 (SEQ ID NO: 81)、CRX82 (SEQ ID NO: 81)、CRX68 (SEQ ID NO: 77)、CRX35 (SEQ ID NO: 71)、CRX04 (SEQ ID NO: 60)、CRX67 (SEQ ID NO: 78)、CRX66 (SEQ ID NO: 77)、およびGH56 (SEQ ID NO: 86)、CRX61 (SEQ ID NO: 80)、CRX84 (SEQ ID NO: 83)、CRX04 (SEQ ID NO: 60)、CRX15 (SEQ ID NO: 64)、CRX08 (SEQ ID NO: 81)、CRX67 (SEQ ID NO: 78)、CRX66 (SEQ ID NO: 77)、GH69 (SEQ ID NO: 87)、およびCRX33 (SEQ ID NO: 69)、CRX04 (SEQ ID NO: 60)、CRX08 (SEQ ID NO: 81)、CRX67 (SEQ ID NO: 78)、DRB181 (SEQ ID NO: 257)、CRX68 (SEQ ID NO: 77)、GH102 (SEQ ID NO: 69)、GH54 (SEQ ID NO: 85)、CRX63 (SEQ ID NO: 82)、CRX35 (SEQ ID NO: 71) からなる群より選ばれる「請求項2」記載の方法

30. RAP05 (SEQ ID NO: 312)、およびRAP06 (SEQ ID NO: 313) からなる群より選ばれるプローブ

immunol. Rev. 86:5 (1985) がある。

クラスII α および β 鎖は別の遺伝子によってコードされ、DR、DQ、および DP 遺伝子はその MHC の別の領域に位置する。DR 領域では、単一の DR 遺伝子座、または遺伝子は多形DR α 鎖をコードするが、DRB1、DRB2 (DRB8ともいわれる)、DRB3、DRB4、および DRB5 と命名された5つの異なる DR 遺伝子座が多形DR β 鎖をコードする。一部の遺伝子座はある種のハロタイプ上のみ存在し (たとえば DR2/ハロタイプ上DRB5)、さらに発現される DR 遺伝子の数もハロタイプ間で変動する (Bohmer: HLA-DRbeta genes vary in number between different DR-specificities, whereas the number of DRbeta genes is constant. J. Immunol. 135:2148, 1985 参照)。

同定された明らかに異なるDRB1対立遺伝子の数は増加を続けている。HLA 系因子についての WHO 命名委員会からの1989年報告では、34の明らかに異なるDRB1対立遺伝子が同定された。これらの対立遺伝子によって、血清学的DR特性 DR1~DRw18 が現れるものと考えられている (WHO 命名委員会による "Nomenclature for factors of the HLA system, 1989" と題する文献. Immunogenetics 31:131-140, 1990 参照。参考として本明細書に導入する)。1990年の報告までに、同定されたDRB1対立遺伝子の数は45にまで上った (WHO 命名委員会による "Nomenclature for factors of the HLA system, 1990" と題する文献. Immunogenetics 33:301-309, 1991 参照。参考として本明細書に導入する)。本発明は、数種の新たに発見された対立遺伝子の配列を提供するものである。

DRB2遺伝子座 (現在はDRB2遺伝子座と呼ばれる) の対立遺伝子は、DR1、DR2、およびDRw10 ハロタイプ上に存在し、発現上発現されない (Erichs: Analysis of isotypic and allelotypic sequence variation in the HLA DRB region using the in vitro enzymatic amplification of specific DNA segments. "Immunology of HLA", Dupont 編, Springer-Verlag, New York, 1991 年刊参照)。

DRB3遺伝子座の対立遺伝子は、スーパータイプ特性DRw52 (DRw52a, DRw52b, およびDRw52c) をコードし、DR3、DRw6、DRw11、DRw12、DRw13、DRw14、DRw17、ならびにDRw18 ハロタイプ上に存在する。

単一対立遺伝子を持つDRB4遺伝子座はDRw53 スーパータイプ特性をコードし、DR4、DR7、およびDRw9 ハロタイプ上のみ存在する (Matsuyama: Structure

HLA DRB の DNA タイピングのための方法および試薬

関連出願の追記参照

本出願は、1988年3月13日出願の現在放棄された一連番号第 839, 331号の一部継続出願である、1988年8月22日出願の現在放棄された一連番号第 899, 344号の一部継続出願である、1989年8月16日出願、係属中の一連番号第 491, 210号の一部継続出願である、1990年12月8日出願、係属中の一連番号第 623, 095号の一部継続出願であり、上記各出願は参考として本明細書に導入される。

発明の背景

発明の分野

本発明は、HLA DRB (DRB) 核酸の DNA タイピングのための方法および試薬に関する。本発明は、RNA またはcDNA調製からなるサンプルを含めた各種起源のホモ接合体またはヘテロ接合体サンプルのタイピング、および現在の血清学的、細胞学的、もしくは生化学的方法では識別できない対立遺伝子の検出を可能にする。本発明のタイピング系は、移植組織のタイピング、個体の同一性の決定、および疾患に罹患しやすい個体の同定を容易にする。したがって、本発明は、一般的に医学の分野、とくに医学的研究および診断の領域、法医学の分野、ならびに分子生物学の分野に応用される。

関連技術の説明

HLA クラスII 蛋白質 HLA DR、HLA DQ、およびHLA DPは、ヒト染色体6の短腕上の主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) の遺伝子によってコードされている。クラスII 蛋白質は、約34kDa および約29kDa からなるヘテロダイマー-糖蛋白質である。クラスII 蛋白質は、マクロファージ、T細胞、活性化T細胞、および他の細胞タイプの表面上に発現し、抗原の結合およびヘルパーTリンパ球への提供に関与する (Giles & Caen: Structure, function, and genetics of the Human Class II molecules. Adv. Immunol. 37:1, 1985 参照)。さらに、クラスII 蛋白質は、成熟Tリンパ球に発現したT細胞受容体のレパートリーを決定することにより、特異的免疫応答に影響する。HLA クラスII 遺伝子および蛋白質の一般的な総説には、Trowsdale の: "Structure, sequence and polymorphism in the HLA D region",

relationships between the DRbeta1 and DRbeta2 subunits in DR4, 7, and w9 haplotypes and the DRw3 Q/T3 specificity. J. Immunol. 137:934, 1986 参照]。

DRB5遺伝子座の対立遺伝子は DR2/ハロタイプ上のみ存在する (Analysis of isotypic and allelotypic sequence variation in the HLA DRB region using the in vitro enzymatic amplification of specific DNA segments, 前出)。

クラスII DR 抗原 (蛋白質) の多形は現在、経電泳から得られたアロ血清を用い、精製リシン/β2 微量細胞傷害試験で分類されている。また、さらに細かい特性によるタイピングを可能にし、アロ反応性T細胞クローンの特異性、またはT細胞受容体のホモ接合体タイピング細胞 (HTC) による刺激に対する増殖応答に基づき、細胞タイピングプロトコールが開発されている。

これらの細胞ベースの分析では、さらに血清学的に定義される多くの抗原、たとえばDR4 の5つのDRサブタイプに細分類されるDR特性が定義される (Gairns: Sequence polymorphism of HLA DR B1 alleles relating to T cell recognized determinants. Nature 317:168, 1985 参照)。しかしながら、血清学および細胞学的いずれのアクセスも困難で、時間がかかる。制限フラグメント長多形 (RFLP) に基づくDNA タイピングプロトコールが開発されている (米国特許第 4,582,788号参照、この記載は参考として本明細書に導入する)。しかしながら、これらのRFLPに基づく分析は大量の高分子重DNA を必要とし、集中的な労力を要し、一方、有益な制限酵素の数が限られているので、得られる結果に制限がある。

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の出現は、複雑なゲノムDNA の分析および操作を容易にした。PCR 法は、核酸のきわめて微量な混合物に発現して、特異的な核酸の増幅を可能にし、米国特許第 4,893,195号、4,683,202号、4,689,818号、および4,685,186号、ならびに欧州特許公告第237,362号に詳細に記載されている。これらの記載は参考として本明細書に導入する。

PCR 法はまた、個体のクラスII HLA DNA のタイピングを容易にする。科学者らは、オリゴヌクレオチドプライマーを設計し、これらのプライマーを異質のある配列の増幅に用いることにより、ゲノムDNA における DR 遺伝子座の多形の第二エクソンを検討してきた (Scharif: Hux Immunol., 22: 81, 1988 の "Sequence analysis of the HLA DRB and HLA DQB loci from three Pemphigus vulgaris

patients' と題する論文参照)。

PCR プライマーが制限酵素認識配列を含有する場合は、増幅されたDNA はシーケンシングベクターに直接クローン化することが可能で、増幅生成物のヌクレオチド配列を容易に決定できる (Scherfr, Hum. Immunol., 233:1076, 1988における "Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequence" と題する論文参照)。

増幅DNA はまた、配列特異的オリゴヌクレオチド (SSO) プローブを使用する検出方法によっても検出できる (Sakita, Nature 324:13, 1988 による "Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA DQalpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes" と題する論文参照)。

これらの進歩にもかかわらず、HLA DRB 遺伝子の複雑さにより、個体のHLA DRB DNAタイプを決定するための有益かつ効率的な手段の開発は妨げられてきた。本発明は、効率的かつ有益なDRB DNAタイプング法の要求に合致する新規な方法および試薬を提供するものである。一方、これらの新規な方法および試薬は、これまで知られていなかったDRB 遺伝子座の発見をもたらし、さらにこれらの遺伝子座は本発明の方法によって分類、同定することができる。

本発明のタイプングシステムは、cDNAから合成されたcDNAのタイプング、ならびに組織、トランスジェニックシステム、育種状態および細胞系における DRB遺伝子の発現のタイプングおよび研究に使用できる。DR抗原を発現しないが、または異常な血清活性を示す細胞、たとえば腫瘍細胞も、容易にタイプングできる。しかも、異常な起源のサンプル、たとえば古代のDNA、法科学サンプルで、EDCが分解してたり、きわめて微量しか分析に使用できなくても、型の判定が可能である。

PCR は標的DNA のフラグメントを百万倍にも増幅できるので、また本発明のシステムは PCR増幅試薬を使用するので、放射標識プローブを使用する必要がなく、西洋フサビニール膜 (HRP) に共有結合させた非同位元素SSO で十分な検出感度を得られる。本発明の特異的に結合した HRP標識プローブの存在は、発色性染料または化学発光性基質による単純なドットプロットフォーマットにより、分単位で検出できる。

発明の要約

図4は、DR4血清学的特異性で細胞系をサブタイプに分類するための HLA DRB DNA タイピング (例5参照) の結果を示す図であり、

図5は、DR3, DR6, DR8 および DR9 の特異性をサブタイプに分類するための HLA DRB DNA タイピング (例6参照) の結果を示す図であり、

図6は、DRB 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例8参照) を表化したものであり、

図7は、多数の異なる細胞系のHLA DRB DNA タイピング (例6および7参照) の結果を示す図であり、

図8は、DR3 細胞系のHLA DRB DNA サブタイプング (例7参照) を示す図であり、

図9は、ヘテロ接合および他の異常なサンプルのHLA DRB DNA 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例7参照) を表化したものであり、

図10は、HLA DRB DNA 型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例9参照) を表化したものであり、

図11、12および13は、DRB 対立遺伝子型を決定するためのプローブハイブリダイゼーションの結果 (例9参照) を表化したものである。

発明の詳細な説明

本発明は、HLA DRB 型判定システム、および DRB対立遺伝子座を分析するための配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ (SSO) を提供する。本発明は、cDNA剪断を包含する各種細胞からのヘテロ接合サンプルのタイプングに使用でき、また血清学的方法では識別できない対立遺伝子座の検出に使用できる。このタイプングシステムは、実行が単純で迅速なドットプロットフォーマットを利用でき、検出可能なシグナルを分単位で検出速度で生成させることができ、組織のタイプングならびに個体の同一性および疾患への関連しやすさの決定に価値が認められる。

本発明は、HLA DRB 対立遺伝子の検出および同定の方法を提供する。確認された明らかになるDRB1対立遺伝子の数は増加を続けている。WHO命名委員会からの1989年報告には、34のDRB1対立遺伝子を掲げられており、この対立遺伝子セットは、本明細書においては、以下1989対立遺伝子セットと呼ぶ。1990年の WHO命名委員会からの報告には45の対立遺伝子が掲げられ、この対立遺伝子セットは以下1990対立遺伝子セットと呼ぶことにする。本発明は、さらに7個の新たな発見

された対立遺伝子の配列を提供する。本発明は、増幅および検出方法、一般およびDRB遺伝子座または群特異的増幅プライマー、DRB1遺伝子座における未知の対立遺伝子の同定のためのプローブを含めた非同位元素配列特異的オリゴヌクレオチド (SSO) プローブ、ならびに血清学的方法では識別できない対立遺伝子を含めて HLA DRB対立遺伝子のタイプングのための迅速、単純かつ正確な系を同時に与える方法を実施するキットを提供する。

本発明の一般法は、サンプル中の核酸のDRB DNA型を決定する方法において、(a) DRB 遺伝子第二エクソンを含有するサンプル中の任意の核酸を増幅し、(b) 工程(a) で増幅された上記核酸を第一のパネルのオリゴヌクレオチドプローブと、これらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、(c) DRB 遺伝子第二エクソンの配列を含有するサンプル中の特異的サブセットの核酸を増幅し、(d) 工程(a) で増幅された上記核酸を第二のパネルのオリゴヌクレオチドプローブとこれらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、ついで(e) 工程(b) および(d) におけるプローブハイブリダイゼーションのパターンからサンプル中のDRB DNAの由来するDRB 遺伝子座を決定する工程からなる方法を提供する。

他の態様として、本発明はサンプルが、DR1, DR2, DR4, DR7, DR8, およびDRw10型からなる群より選ばれる血清学的タイプのDRB1対立遺伝子の核酸を含有するか否かを決定する方法において、(a) サンプル中のDRB1核酸を増幅し、ついで(b) 工程(a) で増幅された上記核酸をオリゴヌクレオチドプローブのパネルとこれらのプローブが10ヌクレオチド長を超える正確に相補性の配列とのみハイブリダイズするような条件下にハイブリダイズさせ、この場合これらのプローブはDRB1第二エクソンのアミノ酸残基9-18をコードする独特の多形配列にハイブリダイズする方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、DRB 一般およびDRB1特異的増幅および検出 (例2参照) の結果を示す図であり、

図2は、DRB1特異的増幅および検出 (例2参照) の結果を示す図であり、

図3は、古典的血清型 DR1-DR10の HLA DRB DNAタイプング (例3参照) の結果を示す図であり、

された対立遺伝子の配列を提供する。

HLA クラスII遺伝子座で最も高度な多形性を示す DRB遺伝子座の多様性、および集団中でのこれらの遺伝子座における多数の対立遺伝子により、サンプル中の核酸が由来する特定の DRB遺伝子座および対立遺伝子の同定を困難にしている。本発明は、この決定を高い特異性をもって真偽し、そのサンプルが採取された特定の個体の同定を可能にする。さらに、この識別力は、本発明の法科学分野における応用を可能にするものである。

PCR (または他の増幅方法) をきわめて少量の DNA (または分解DNA) の増幅に使用することができるので、本発明は、異常な起源、たとえば口内粘膜、一本の毛、または保存された古代の標本のDNA のようなサンプルからのHLA DRB DNA の型の判定に使用できる。古代標本サンプルの場合には、有史以前起源のたとえば初期猿人の対立遺伝子の分析が可能である。

本発明の方法は、DRB 遺伝子座を発現しない細胞のDRB DNA 型の決定に使用できる。しかしながら、この方法はまた、DRB cDNAから合成されたcDNAのDRB DNA 型の決定にも適している。この方法は、様々な細胞系または組織における HLA DRBの発現の研究を容易にし、HLA DRB発現と形質転換、自己免疫、または他の健康状態に対する感受性との間に関連があるかどうかの決定に使用できる。

本発明の研究への利用可能性としては、直接的な臨床応用が明白である。MHCの遺伝子および遺伝子座物は個体の免疫学的状態に中心的役割を果たし、特定のMHC 遺伝子座物が疾患の抵抗性および感受性に関連している。本発明は、サンプル中のMHC DRB 遺伝子座物の測定を可能にし、本発明はまた、医学とくに医学的診断方法の分野に適用できる。

このシステムの識別力は、移植または移植片対宿主病の危険を最小限にするために極めて性格な HLA DRBマッピングが必須と思われる移植ドナーの型の判定に有用である (PojJackra, J. Clin. Immunol. 3:341, 1983)における "Mixed lymphocyte reactions for individuals with phenotypic identity for specific HLA DR determinants: The role of linkage disequilibrium and of specific DR and other Class II determinants" と題する論文参照)。疾患感受性に関する研究では、DRB 対立遺伝子における単一のヌクレオチドの相違が医学的に重要であることが示されている (Scherfr, "Specific HLA-DRB and HLA-DRB1 alleles confer

susceptibility to Peronig vulgaris". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:215, 1989
ならびに Kapon et al. "Identification of HLA-Dw14 genes in DR4+ Rheumatoid
Arthritis". Lancet, 1992, 340, 1688 (参照)。

上述の利益に加えて、本発明はまた、以前には知られていなかったDR対立遺伝子を同定する方法、および関連プライマー、プローブ、ならびに DRB対立遺伝子の同定方法を提供する。このタイピングシステムを使用する異種パターンは、SSOプローブハイブリダイゼーションでは、"Boguit" 細胞系の DNAタイピングによって表示されるように (例7参照)、新しい対立遺伝子が同定される。この細胞系はDRB1遺伝子座において異種パターンのプローブハイブリダイゼーションを示し、現在はDRB1*1103 (配列同定番号 (SEQ ID NO): 27) と命名された。以前には報告されていなかった配列が明らかになった。

同様にして、ライム病の患者のDRB1対立遺伝子の本発明の分析で、新しいパターンは患者のゲノムDNA からクローン化され、配列が決定された。患者のDRB1対立遺伝子の配列は、これまでに報告されているDRB1対立遺伝子とは異なり、新たに、DR*LY10 (また、DRB1*LY10) と命名された。その患者における他の対立遺伝子はDRB1*0402であった。DR*LY10対立遺伝子は、5'-末端に、DRB1*0801, *0802, *0803, および*1201に、そして3'-末端に、*1401に類似の配列の領域を持つ。本発明は、DR*LY10対立遺伝子を他のDRB対立遺伝子から識別するためのプローブを提供する。DR*LY10対立遺伝子は、現在はDRB1*1404 (SEQ ID NO: 40) と命名されている。

他の新たに発見されたDRB1遺伝子座のDRB1対立遺伝子は、最初DR*PEV' と命名されたDRB1*1305 (SEQ ID NO: 39), DRB1*1303 (SEQ ID NO: 34), および最初はDRB1*0603 と命名されたDRB1*1105 (SEQ ID NO: 29) である。いずれも、本発明の方法による分析が新たなパターンは患者のゲノムDNA からクローン化され、配列が決定された。患者のDRB1対立遺伝子の配列は、これまでに報告されているDRB1対立遺伝子とは異なり、新たに、DR*PEV' (また、DRB1*PEV') と命名された。その患者における他の対立遺伝子はDRB1*0402であった。DR*PEV'対立遺伝子は、5'-末端に、DRB1*0801, *0802, *0803, および*1201に、そして3'-末端に、*1401に類似の配列の領域を持つ。本発明は、DR*PEV'対立遺伝子を他のDRB対立遺伝子から識別するためのプライマーおよびプローブを提供する。

本発明はまた、本発明の DRBタイピング法の実施をより便利にするためのキッ

トを提供する。一種のキットは、増幅およびタイピングの両試薬を含む。他のキットは、本発明の1種または2種以上の DRBプローブのみを含む。いずれのキットにおいても、プローブは凍結されているかまたは乾燥されているか、または固体支持体に結合されているか、またはプライマーをキット中に入れる場合は、検出を容易にするため、すなわち、シグナル増強試薬の結合または固定のために標識することができ、キットにはまた、プローブハイブリダイゼーションを容易にするための試薬、すなわち染色試薬DRB およびストレプトアビジン結合西洋フサビエルオキシダーゼを含むことができる。要約すれば、本発明の方法の真価は、本発明の利用を促進する任意の配置でパッケージ化できる。

各対立遺伝子の第二のエクソンのヌクレオチド配列は、コードされるアミノ酸配列とともに、配列掲載部に示す。以下の表1および2には、1988対立遺伝子セットにおける対立遺伝子の相対するヌクレオチド配列情報と、比較が容易な形式で掲げる。表1にはまた、対立遺伝子 DRB1*0101 の核酸配列、ならびにコードされるアミノ酸配列を三文字および一文字の両コードで示す。同様に、表2には、相対するアミノ酸配列を一文字コードを用いて示す。各対立遺伝子の配列同定番号 (SEQ ID NO) を以下に示す。DRB1*1603, DRB1*0303, およびDRB1*1105を除き、すべての対立遺伝子は、1990年 WHO命名委員会報告 (上述、1990対立遺伝子セット) に掲載されている。DRB1*1603の配列については、Desmet et al. Hum. Immunol. 30:41-44, 1991 も参照されたい。

表1、2および3に掲載されない対立遺伝子のヌクレオチド配列は、配列掲載部のほか、以下の表9に掲げる。

対立遺伝子	SEQ ID NO:	対立遺伝子	SEQ ID NO:
DRB1*0101:	SEQ ID NO: 1	DRB1*1201:	SEQ ID NO: 30
DRB1*0102:	SEQ ID NO: 2	DRB1*1202:	SEQ ID NO: 31
DRB1*0103:	SEQ ID NO: 3	DRB1*1301:	SEQ ID NO: 32
DRB1*0301:	SEQ ID NO: 4	DRB1*1302:	SEQ ID NO: 33
DRB1*0302:	SEQ ID NO: 5	DRB1*1303:	SEQ ID NO: 34
DRB1*0303:	SEQ ID NO: 6	DRB1*1304:	SEQ ID NO: 35
DRB1*0401:	SEQ ID NO: 7	DRB1*1305:	SEQ ID NO: 36
DRB1*0402:	SEQ ID NO: 8	DRB1*1401:	SEQ ID NO: 37
DRB1*0403:	SEQ ID NO: 9	DRB1*1402:	SEQ ID NO: 38
DRB1*0404:	SEQ ID NO: 10	DRB1*1403:	SEQ ID NO: 39
DRB1*0405:	SEQ ID NO: 11	DRB1*1404:	SEQ ID NO: 40
DRB1*0406:	SEQ ID NO: 12	DRB1*1405:	SEQ ID NO: 41
DRB1*0407:	SEQ ID NO: 13	DRB1*1501:	SEQ ID NO: 42
DRB1*0408:	SEQ ID NO: 14	DRB1*1502:	SEQ ID NO: 43
DRB1*0409:	SEQ ID NO: 15	DRB1*1503:	SEQ ID NO: 44
DRB1*0410:	SEQ ID NO: 16	DRB1*1601:	SEQ ID NO: 45
DRB1*0411:	SEQ ID NO: 17	DRB1*1602:	SEQ ID NO: 46
DRB1*0701:	SEQ ID NO: 18	DRB2*0101:	SEQ ID NO: 47
DRB1*0801:	SEQ ID NO: 19	DRB3*0101:	SEQ ID NO: 48
DRB1*0802:	SEQ ID NO: 20	DRB3*0201:	SEQ ID NO: 49
DRB1*0803:	SEQ ID NO: 21	DRB3*0202:	SEQ ID NO: 50
DRB1*0804:	SEQ ID NO: 22	DRB3*0301:	SEQ ID NO: 51
DRB1*0901:	SEQ ID NO: 23	DRB4*0101:	SEQ ID NO: 52
DRB1*1001:	SEQ ID NO: 24	DRB5*0101:	SEQ ID NO: 53
DRB1*1101:	SEQ ID NO: 25	DRB5*0102:	SEQ ID NO: 54
DRB1*1102:	SEQ ID NO: 26	DRB5*0201:	SEQ ID NO: 55
DRB1*1103:	SEQ ID NO: 27	DRB5*0202:	SEQ ID NO: 56
DRB1*1104:	SEQ ID NO: 28		
DRB1*1105:	SEQ ID NO: 29		

以下の表1、2および3では、最近同定された"PEV" および"LY10"対立遺伝子を除いて、すべての配列は、上述の1990年 WHO HLA命名委員会報告に掲載されている。DRB1*0101のヌクレオチド配列はコンセンサス配列として動く。コンセンサス配列についての推定アミノ酸配列はヌクレオチド配列の上部に一文字三文字コードで記載する。配列のモジュールは横線で表示し、文字は多形位置を示す。表中のアラインメントの右端に記載した設計 SSOプローブおよびプライマーは、四角で囲った配列の領域と同一の配列であるか、またはそれと相補性である。アラインメントの端に2つの名前がある場合は、最左端の名前が最左端の四角に相当し、最右端の名前が最右端の四角に相当する。プローブ効果は、すべての DRB対立遺伝子に示された領域にハイブリダイズされる。

A, BおよびCと命名された3部からなる表1には、DR特異性 DR1~DR18に相当する35 DRB1対立遺伝子のヌクレオチド配列を示す。

表2は、DRB2, DRB3, DRB4, およびDRB5遺伝子座の対立遺伝子についてのヌクレオチド配列アラインメントを示す。DRB1対立遺伝子の配列多形の主要領域は、アミノ酸位置 9-18, 25-34, 87-74, および88に属し、第二のエクソン配列の終端は比較的不変である。

表3には、DRB対立遺伝子によってコードされる推定アミノ酸配列アラインメントを示す。アミノ酸配列の分析から、数種の異なる対立遺伝子に見出される特定の多形配列をもつ複雑な、しかし限定されたパターンの多形が明らかになった。しかしながら、一部の多形配列は各対立遺伝子に独特である。DR1, DR2, DR4, DR7, DR8, およびDR10対立遺伝子はそれぞれ、DRB1遺伝子座最初の超可変領域 (位置 9~16) に独特の多形配列を有し、これは SSOタイピングによる血清学的DR特異性の決定に使用できる。これに対し、DR3, DR11, およびDR16対立遺伝子は、多形エピソード "Y9TS" を共有し、この領域のプローブ単独では識別できないが、各対立遺伝子の他の位置における多形によって識別可能である。同様に、DR6とDR12も、この領域では識別できない。

表1B

表1B: 表1Aの続き。表の構造は表1Aと同様で、列番号125から440まで、行番号0001から0011までが示されています。表の内容は、特定の列と行の交点に記号が配置されている形式です。

表1A

表1A: 表の上部部分。列番号125から440まで、行番号0001から0011までが示されています。表の内容は、特定の列と行の交点に記号が配置されている形式です。

表2

表2: 表の下部部分。列番号125から440まで、行番号0001から0011までが示されています。表の内容は、特定の列と行の交点に記号が配置されている形式です。

表1C

表1C: 表の下部部分。列番号125から440まで、行番号0001から0011までが示されています。表の内容は、特定の列と行の交点に記号が配置されている形式です。

表2
34のHLA DRB1対立遺伝子 (1989セット) 中31を識別する
SSOプローブの組み合わせ

DRB1	プローブ	DRB1	プローブ
0101	CRX00 + CRX09 + CRX56	1103	GH122 + GH56 + CRX37 + CRX08
0102	CRX00 + CRX04	1104	GH122 + GH56 + CRX35 + CRX37
0103	CRX00 + CRX06 + CRX56	1301	GH102 + GH54 + CRX03
0602	GH105	1301	GH56 + CRX06 + CRX37
0301	GH56 + GH123 + CRX30 + CRX37	1301	GH56 + CRX06 + CRX37
0302	GH56 + CRX30 + CRX35	1303	GH56 + CRX02 + CRX61 + CRX16
0401	GH59 + CRX31 + CRX54	1401	GH56 + CRX23 + CRX37
0402	GH59 + CRX06 + CRX37	1402	GH56 + CRX06 + CRX35
0403, 0406	GH19 + CRX15 + CRX37 + CRX04	DR*PBEV*	GH56 + CRX15 + CRX35
0404	GH59 + CRX04 + CRX31	0701	CRX48 + GH54 + CRX35
0405	GH59 + CRX04 + CRX61 + CRX35	0801	GH102 + CRX61 + CRX35 + CRX56
0407	GH59 + CRX15 + CRX36 + CRX04	0802	GH102 + CRX31 + CRX56
0408	GH59 + CRX04 + CRX35	0803	GH102 + CRX61 + CRX63 + CRX56
1101	GH122 + GH56 + CRX35 + CRX36	0901	GH111 + GH54 + CRX35
1103	GH122 + GH56 + CRX06 + CRX37	1001	CRX34 + CRX35
		DR*LV10*	GH102 + CRX03 + CRX37

“HRP-SSO”と呼ばれる本発明の西洋ワサビペルオキシダーゼ複合SSOには、使用が簡単で検出可能なシグナルを迅速に（通常1～10分）生成する発色性または化学発光性基質を使用する検出方法が好まれる。HRP-SSOは4℃で保存すれば、活性の明らかな低下を伴うことなく2年以上にわたって安定である。PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, Gelfand, Sninsky & White 編, Academic Press, Inc., San Diego, 1990年) 中の Levenson & Chang (による “Nonisotopically labeled probes and primers” と題する論文を参照。放射線標識プローブも使用できるが、本発明によって与えられる重要な利益は優れた感度であって、その必要はない。

検出のためのドットプロットフォーマットは、多数のサンプルの迅速なタイピングを可能にし、HLA DRB1の対立遺伝子頻度の決定に有用である。PCR/SSO DRB1タイピング用に最近開発された変法に固定化逆相ドットプロットフォーマットが

化すると内部Pst I部位により 243bp産物が生成する。

すべてのハロタイプ (DR2, DR7, およびDR9を除く) からのDRB1対立遺伝子は、PCR プライマー-GH48およびCRX37によって特異的に増幅された。CRX37プライマーの配列を以下に示す。

CRX37 SEQ ID NO: 73 5'-GAAATCCCGGCGCCGCGCT

GH48/CRX37プライマー対での増幅は 287bpフラグメントを産生する。プライマー-CRX37は5'-末端にEcoR I制限エンドヌクレアーゼ認識配列を挿入してクロニングを容易にし、プライマー-DR48/GH50と異なり、このプライマーでの増幅およびBamH I/EcoR I消化は完全長 PCR産物の単離および分析を可能にする。

このような単離および分析は多くの場合、PCR産物のヌクレオチド配列の決定を含む。HLA DRB1対立遺伝子の配列決定には、1 μgの精製ヒトゲノムDNAをプライマー-DR48/GH50 およびGH48/CRX37を用いて増幅した。増幅されたDNAを、Scharfら:Hum. Immunol. 22:81, 1988 およびScharfら:Hum. Immunol. 23:1078, 1986 (これらの記載は参考として本明細書に導入する) に記載の方法によって、M13p10にクローニングした。挿入体を次に、Sangerら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:6463, 1977に記載のジデオキシシチエンターミネーション操作 (1988年9月23日出願の米国特許出願第 248, 387号も参照。この記載は参考として本明細書に導入する) によって配列決定した。

上記表1および2に示した配列は、ゲノムクローニングにより (Hornら: Hum. Immunol. 21:248, 1988, 参照。この記載は参考として本明細書に導入する) PCR 増幅により (Erichら:Immunobiology of HLA (du Pont編, Springer-Verlag, New York) 1989 年刊, およびScharfら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8215, 1989参照。この記載は参考として本明細書に導入する) 又は文献 (WHO命名委員会: Immunogenetics 31:131, 1990; および Gregersonら: First domain diversity of DR and DQ subregion alleles in immunobiology of HLA (du Pont 編, Springer-Verlag, New York) 1989年刊参照) から得られたものである。

サンプルは、Tag ポリメラーゼ (PECI, Norwalk, CT) 1.25単位 (2.5単位でなく) を反応容量 100 μl あたり加えたほかは上述の反応条件を用い、32サイクル (とくに指示のない限り) で増幅した。膀胱癌患者についてのcDNAを、HLA-DRB1遺伝

ある。Seklaら:Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8230, 1989 および1989年5月4日出願の発明中の出願番号第 347, 486号参照。これは参考として本明細書に導入する。この操作においては、SSOプローブはフィルターに適用され固定されるので (フィルターに適用され固定される増幅DNAよりも)、「逆相ドットプロット」の題が使用される。

逆相ドットプロット操作によれば、単一のサンプルを、一連の固定化プローブを含有する膜と1回ハイブリダイズさせることで分析が可能となる。サンプル板が使用プローブを越える場合 (たとえば、患者対コントロールまたは集団遺伝学研究) では慣用のドットプロットフォーマットが有用である。逆相ドットプロットフォーマットは、鑑別的、診断的、および疫学的分析の場合に価値がある。逆相ドットプロットフォーマットは例目に詳細に記載する。

以下の実施例は本発明の好ましい実施態様を例示するものである。この例は、本発明が、好ましい実施態様においては、多様な起源からの様々なサンプルについての単純、迅速かつ正確な DRB1タイピングを可能にするHLA DRB1タイピングのための非同位元素PCR/SSO システムを提供するものであることを示している。

例1

増幅および検出方法

プローブの第一のパネル (表4) でのサンプルのタイピングには、0.5 μgのヒトゲノムDNAを、Seklaら:Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. Science 239:487, 1988; Scharfら:Hum. Immunol. 22:81, 1988; およびScharfら:Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8215, 1988に記載された反応成分を用いて増幅した。これらの文献は参考として本明細書に導入する。

HLA DRB1 一般的 PCRプライマーはGH48およびGH50である。これらのプライマーの配列を以下に示す。

GH48 SEQ ID NO: 67 5'-CCGGAATCTCTTCTGTCTCCCAACAGCAAG
GH50 SEQ ID NO: 68 5'-CTCCCAACCCCTAGTGTGTCTCTCA

プライマーは反応混合物中に500nM存在させた。これらのプライマーは、272塩基対 (bp) フラグメントを生成し、PCR 産物をクローニングするためのBamH I およびPst I制限部位の配列を含有する。増幅DNAをBamH I およびPst Iで消

子座で、報告されているように (Kawaaski: "Amplification of RNA" In PCR protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら編, Academic Press, San Diego) 1989 刊参照) 増幅した。すべてのサンプルを滅菌紅油 (Sigma, St. Louis, MO) 100 μl で覆い、蒸気防止した。増幅後、紅油被覆液を 100 μl のグロバホルムで抽出した。

各サイクルの熱プロフィールは以下の温度での指示時間のインキュベーションとした。すなわち、94℃で45秒 (DNAの解離)、65℃で45秒 (プライマーのアニリング) および72℃で45秒 (伸長) である。最終サイクルののちに、PECIサーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk, CT) は、最終の伸長が完全に行われることを確認するため、サンプルを72℃で10分間インキュベートするようにプログラムした。サンプルの交差検出を避けるための注意が必要である。とくに、一つのPCRの産物を非増幅サンプルと交差させることは防止しなければならない。1989年7月24日出願の米国特許出願第 567, 517号およびその出願の1989年11月2日付 CIP出願 (いづれも、参考として本明細書に導入する) には、非増幅サンプルに「キャリオーバー」した PCR産物の増幅を防止する好ましい方法が記載されている。

増幅後、増幅DNAの小部分を変性し、一連のナイロンフィルターへのクロスリンクに適用した。各フィルターをついて膜探プローブの一つにハイブリダイズした。各 SSOプローブは西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) に共有結合で結合させ、発色性または化学発光性基質の存在下における非同位元素検出手段を提供する。ヌクレオチド配列、コードされたアミノ酸 (またはエピトープの可能性) および固定されるDR型、ならびに各プローブの洗浄条件を表4および5に掲げる。

すなわち、各増幅 DNAサンプル5 μl を、0.4M NaOH および 25mM EDTA からなる混合物 100 μl と混合し、得られた混合物を、ドットプロットマニフォールド (BioRad Richmond, CA) を用いて BioDyne Bナイロンフィルター (Pall Corp., Glen Cove, NY) に適用した。まだドットプロットマニフォールド中にあるフィルターを、10mM Tris-HCl および0.1mM EDTA からなる混合物 pH 8.0 で洗浄し、Whatman 3MM 濾紙で乾燥させた。StratallinkTM (Stratagene, La Jolla, CA) UV光線ボックスを用い、出力 65mJ/cm² の紫外線照射により、DNAをナイロンフィルター上に固定化した。

他の記載がない限り、フィルターはすべて、 $2 \times \text{SSPE}$ (食塩リン酸ナトリウム EDTA), $5 \times \text{デンハルト溶液}$ および $0.5\% \text{SDS}$ 中、ハイブリダイゼーション溶液 1 ml あたり 2 pmole の HRP-SSO プローブを用いて、 42°C で 15 分間ハイブリダイズした。西洋サビバロオキシダーゼ複合オリゴヌクレオチドは、Levenson & Chang: In PCR Protocol: A Guide to Methods and Application (Innistrum Academic Press, Inc., San Diego) および Seki et al. Eng. J. Med. 319: 537, 1988 の記載に従って製造された。各プロローブのフィルターは 25 ml の SSPE 溶液中、表 4 および 5 に示した温度で 15 分間 (他の記載がない限り) 洗浄した。

洗浄後、発色性の染料基質で展露すべきフィルターは、PBS 中室温で 30 分間洗浄し、ついで 0.1 mg の $3,3',5,5'$ -テトラメチルベンジジン (TMB) (Fluka) を 1 ml あたり、および 0.0015% の過酸化水素を含有する 100 mM クエン酸ナトリウム中に取り、緩やかに攪拌しながら室温で 5~15 分間インキュベートした。展開したフィルターを PBS 中ですすぎ、直ちに撮影した。化学発光検出系 (ECL; Amersham, Arlington Heights, IL) で展開したフィルターは PBS 中で 5 分間すすぎ、緩やかに攪拌しながら ECL 溶液中に 1 分間置いた。ついで、フィルターは室温で 1~5 分間 X 線に露出した。

例 2

DRB1 特異的増幅

各種 DRB1 対立遺伝子を識別する DRB1 遺伝子の対立遺伝子の数種の多形配列は、他の DRB3 遺伝子の対立遺伝子にも存在する (表 3 参照)。DR3 DRB1 対立遺伝子上のエピトープ "K-GR" (コドン 71~74) をコードするヌクレオチド配列がその例であり、この領域に対するプロローブ (CRX36) は DR*1 および DR*6 対立遺伝子から DR3 を識別できる。しかしながら、このエピトープは、DRB3 対立遺伝子 DR*52a (DRB3*101) によってもコードされ、一部の DR*6/ハロタイプおよび一部の DR3/ハロタイプ上にも同様に存在する。PCR プライマー GH48/GH50 はすべての DRB3 遺伝子を増幅するので、DRB3 遺伝子座において DR*52a であった DR*6 サンプルを、このプロローブを用いて DR3 サンプルから識別することは不可能である。

本発明は、DRB1 遺伝子座のみを特異的に増幅する PCR プライマーを提供することによって、この問題を解決する。これらのプライマーの一つは、第二のエクソンからすぐ下流のイントロン領域にハイブリダイズする。イントロンは、DRB1

と DRB3 遺伝子座を識別する配列を含有する。プライマー (CRX37) は DRB1 イントロン配列に特異的にハイブリダイズし、このプライマーを GH48 と組み合わせると大部分のハロタイプについて、DRB1 特異的増幅を可能にする。

DRB1 遺伝子座がこれらの DRB1 特異的プライマー-塩対で増幅される唯一の遺伝子座であるかどうかを確認するために、DR2, DR3, および DR4 HTC (ホモ接合タイピング相関) DNA を、これらのプライマーおよびすべての DRB3 遺伝子座のための SSO プローブで増幅し、分析した。DRB1 遺伝子座に加えて、DR2 ハロタイプは DRB2 および DR3 5' 遺伝子座を有し、DR3 ハロタイプは DRB3 5' 遺伝子座を有し、DR4 ハロタイプは DRB4 5' 遺伝子座を有する。結果は図 1 に示す。

これらの結果を得るには、約 200 ng の HTC DNA を一般的 DRB プライマーである GH48/GH50 または DRB1 特異的プライマー GH48/CRX37 によって増幅し、例 1 の記載のようにフィルターに適用した。増幅相関 DNA (サンプル 1~4) を含有する各フィルターは図 1 に示すプロローブとハイブリダイズさせた。各プロローブがハイブリダイズする遺伝子座をカッコ内に示す。CRX36 は DR4, DR7, および DRB3 の DRB4 遺伝子座にハイブリダイズする。CRX22 は DRB3 対立遺伝子 DR*52b にハイブリダイズする。

SSO の配列:

CRX36	SEQ ID NO: 72	5'-CCCGCCCTCCGCTCCGA
CRX22	SEQ ID NO: 65	5'-AAGCTCTCTTAAAGTCT

は、Scharf et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8216, 1991 によって記載されている。この配列は本明細書に導入する。

プロローブ GH91 (SEQ ID NO: 88, 5'-CTCCCTTTATGATGATAT) は DRB3 遺伝子座に特異的にハイブリダイズする。このプロローブは例 1 に記載したようにハイブリダイズさせ、 $1 \times \text{SSPE}$, $0.1\% \text{SDS}$ 中、 42°C で 15 分間洗浄した。増幅されたサンプルは、(1) No DNA (陰性対照); (2) DR2 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; および (4) DR4 HTC "BSW" である。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、プロローブは増幅した核酸複合体で検出された。

図 1 は、3 つの HTC サンプルについてのすべての DRB3 遺伝子座は一般的 DRB プライマーで増幅するが、DRB1 特異的プライマーは DR3 および DR4 HTC からの DRB1 遺伝子座を増幅するのみであることを示している。興味あることに、DR2 HTC に付

いては、DRB2 遺伝子座は、弱いとはいえ、DRB1 特異的プライマーで増幅される。DRB1 特異的プライマーは、図 1 および 2 に示すように、DR2, DR7, および DR9 を除き、試験されたすべての DR/ハロタイプからの DRB1 配列を効果的に増幅する。図 2 に示す結果を得るには、HTC からのゲノム DNA 約 $0.5 \mu\text{g}$ を、DRB1 特異的プライマー GH48/CRX37 と、HLA DRB について増幅した。増幅反応およびフィルターは、例 1 に記載したのと同様にした。各フィルター片は示したプロローブの一つと、適当なハイブリダイゼーション条件下にハイブリダイズし、洗脱条件下に洗浄した (表 4, 5 および 7 参照)。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、フィルターは発色性基質 TMB で展開した。サンプルは、(1) DR1 HTC "KASPO03"; (2) DR1 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; (4) DR4 HTC "BSM"; (5) DR5 (DR*11) HTC "SPOO10"; (6) DR*6 HTC "QMW"; (7) DR7 HTC "MOU"; (8) DR*8 HTC "SPACH"; (9) DR9 HTC "DKB"; および (10) DR*10 HTC "SHY" である。

図 2 の結果は、DR7 プロローブ CRX49 ("G-YC") が、この実験では強く増幅された DR7 HTC にはハイブリダイズしないことを示している。これらの結果から、完全な DRB1 タイピングには一般的および DRB1 特異的プライマーを使用できることが明らかである。

例 3

血清 DR 型 1~10 のタイピング

HTC からのゲノム DNA 約 $0.5 \mu\text{g}$ を、HLA DRB について増幅した。3 および 5 番の数を除くすべてのサンプルは一般的プライマー GH48/GH50 で増幅した。3 および 5 番のサンプルは、DRB1 特異的プライマー GH48/CRX37 で増幅した。増幅反応およびフィルターは、例 1 に記載したのと同様にして準備した。各フィルター片は示したプロローブの一つと、適当なハイブリダイゼーションおよび洗脱条件下にハイブリダイズさせた (表 4, 5 および 7 参照)。プロローブおよび洗浄後、フィルターは発色性基質 TMB で展開した。サンプルは、

(1) DR1 HTC "KASPO03"; (2) DR2 HTC "SCHU"; (3) DR3 HTC "QBL"; (4) DR4 HTC "BSM"; (5) DR5 (DR*11) HTC "SPOO10"; (6) DR*6 HTC "QMW"; (7) DR7 HTC "MOU"; (8) DR*8 HTC "SPACH"; (9) DR9 HTC "DKB"; および (10) DR*10 HTC "SHY" である。

図 3 は、古典的、血清学的に定義された DR 型 1~10 についての、HTC のパネル

上での DR タイピングの結果を示す。各古典的 DR 型の検出に単一のプロローブを使用することができ、2 つの異なる PCR プライマーが必要であった。DR3 および DR*6 を除くすべてのサンプルで、一般的 PCR プライマー GH48/GH50 が使用できる。この系列の DR3 および DR*6 サンプルの DNA の増幅には、DRB1 特異的プライマー GH48/CRX37 を使用した。DR3 HTC "QBL" (DR*17) 上の "Y" エピトープ (GH125; コドン 26) を検出するために使用されたプロローブは、DR*6 サンプルの DR3 対立遺伝子 (DR*52a) 上にも存在するからである。標準 DRB プライマーを使用されていたならば、"Y" プロローブは DR*6 サンプルにも同様にハイブリダイズしたと考えられる。

例 4

一般的 DRB1 タイピング戦略

特定のサンプルのタイピングに関しては、一般的プライマーを最初の増幅に使用し、ついで増幅 DNA を最初のパネルのプロローブによってプロローブ化しなければならぬ (表 4 および 7)。このパネルのプロローブは大部分の血清型を特定するが、GH58 ("YST") は DR*8 から DR3 を明らかに識別しない。

GH58 で陰性を示したサンプル、または特定の DR 型の組合せ (たとえば、DR4 の DR*6 または DR*8 のサブタイプ) するサンプルには、第二のパネルのプロローブ (表 6) を使用しなければならない。上述のように、第二のパネルの一部のプロローブは PCR プライマーの DRB1 特異的対による増幅を要求する。第一および第二のパネルからのプロローブを組み合わせることにより、1988 対立遺伝子セットにおける 34 の DRB1 対立遺伝子中、31 の識別ができる。これらの対立遺伝子の同定に用いられる SSO プロローブの組み合わせを表 8 に示す。これらのプライマーおよびプロローブによっては DR2 サブタイプ (DRB1*1601, *1602, *1601, および *1602) は識別されず、これらのプロローブによっては DRB1*4033 と DRB1*4036 対立遺伝子は識別されない。

本発明の一つの DR2 プロローブは、DRB5 遺伝子座の唯一の超可変領域 ("Q-D-Y") にハイブリダイズする配列からなる。DRB5 遺伝子座はすべての既知 DR2/ハロタイプ上に存在し、それらのハロタイプ上にしか存在しないので、このようなプロローブは、一般的 DRB プライマーで増幅した DR2 の型の判定に信頼をもって使用できる。プロローブ GH104 ("V-P-R") は DR2 DRB1 遺伝子座の第一の超可変領域にハイブリダイズし、一般的プライマーで増幅すると DR2 DNA に特異的にハイブリダイズす

る(図1)が、DR81特異的プライマーではハイブリダイスしない。これらの2つのプローブは一般的プライマーでの増幅においては、DR2の同一のインジゲーターである。

例5

DR4のサブタイピング

DR4 特異性のサブタイピングは血清学的には困難でない。サブタイプは二次抗原白質ゲル電気泳動および順読性タイピングによって明らかにされたが、両方法とも煩雑で時間がかかる。Dw4, Dw10, Dw13, およびDw14は互いに、遺伝子の第三の超可変領域の位置70~74で異なっている。Dw15はまた、位置57にセリン("S")を有する。Dw13はまた、位置71にDw14およびDw15と同じアルギニン残基を有するが、位置74のグルタミン("E")で異なっている。

結果として、SSO プローブ、CRX04("R")はDw13, Dw14, およびDw15対立遺伝子にハイブリダイスする。これらの対立遺伝子を互いに識別するには、さらにプローブが必要である。SSO プローブ、CRX15("R-E")はDw13をDw14およびDw15から特異的に識別し、CRX01("S")はDw14からDw15を特異的に識別する。様々なDR81対立遺伝子(たとえばDw14, 1またはDw14, 2からのDR81+0403 またはDR81+0408)を識別する位置88の"G"対"V"多形はCRX58 プローブ("G") およびCRX57 プローブ("V")を用いて検出される(表5参照)。

DRタイプ1~10のHCT および5つのDR4 Dwサブタイプは、DR81特異的プライマー-GH46/CRX37で増幅し、6つの同一のナイロンフィルターに適用し、Dw型に特異的なHAP-SSO とハイブリダイスさせた。結果は図4に示す。

図4に示した結果を得るには、約 500 ng のHCT ゲノムDNA を上述のDR81特異的プライマー-GH46/CRX37によって増幅した。AおよびBの対のフィルターそれぞれを図4に示すプローブとハイブリダイスさせた。サンプルは、列Aでは、

(1) No DNA control; (2) DR1 HCT "KAS9003"; (3) DR2 HCT "SCHU"; (4) DR3 HCT "QBL"; (5) DR4 Dw4 HCT "SSM"; (6) DR4 Dw10 HCT "YAR"; (7) DR4 Dw13 HCT "SEA"; (8) DR4 Dw14 HCT "BM92"; (9) DR4 Dw15 HCT "LKT3"; (10) DR5 HCT "SPOO10"; および(11) DRw6 HCT "OMW"; 列Bは (1) No DNA control; (2) DR7 HCT "MOU"; (3) DRw8 HCT "SPACH"; (4) DR9 HCT "DKB"; および (5) DRw10 HCT "SHY"である。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、プローブは増強化学ルミネッセンス

スで検出された。パネルAは、DR2, DR7, およびDRw9 HCTを除くすべてがCRX12にハイブリダイスすることを示している。

パネルBは、CRX63 ガワ4 HCT BSM に特異的にハイブリダイスすることを示している。DR4 Dw4 のタイピングのための他のプローブには、DR8103 (SEQ ID NO 230)があり、例6に記載のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。スズ。低い洗脱条件 (2 × SSPE, 5 × デンハルト, 0.5% SDS, 42°C 15分ハイブリダイゼーションおよび2 × SSPE, 0.1% SDS, 42°C 15分洗浄) であるが強いシグナルを与える。DR4 Dw4のタイピングのためのさらに他のプローブは、以下に示すプローブCRX64 である。

CRX64 SEQ ID NO: 83 5'-ERP-GAGGAGAAAGCGCCG-3'

HSP は西洋ワサビペロキシダーゼである。I はイノシンで、これはプローブを不安定化する。

パネルCはDw10 HCT "YAR" の SSO CRX08 ("I-0E")による検出を示す。このプローブはHCT "OMW"にもハイブリダイスし、これはDR813 でありこの多形を共有する。

パネルDは CRX15の特異的ハイブリダイゼーションを示し、これはDR813 サンプルJHA を、Dw14 サンプルB02 およびDw15 サンプルLKT3から識別する。

パネルEは、CRX04 の、それぞれDw13, Dw14, およびDw15である JHA, BM92, およびLKT3へのハイブリダイゼーションを示す。CRX04 はDR81+0101 である DR1 HCT KAS9003 にもハイブリダイスし、これらの3つのDw型とこの多形("R")を共有する。DR4 Dw14型は、サンプルがCRX15("R-E")またはCRX01("S")パネルのいずれにもハイブリダイスせず、CRX04("R")とハイブリダイスするプローブハイブリダイゼーションパターンから、推測される。パネルFは CRX01のDw16 HCT "LKT3"へのハイブリダイゼーションを示す。

図4は、一般的に、本発明が、第一のパネルのプローブへのハイブリダイゼーションのパターンにより、これらのプローブで増幅される多形領域を共有するサンプルを識別できることを示している。たとえば、"R" エピトープ特異的DR4 Dw型はGH59 ("V-H") 陽性およびCRX60 ("V-L-F") 陰性により DR1から識別され、DR4 Dw10は、GH59陰性およびGH58 ("YSTS") 陽性により DRw13から識別される。

表8は、このシステムが識別できない2つの DR4サブタイプがDR81+0403 およびDR81+0408 対立遺伝子であることを示している。これらの2つの対立遺伝子は

2つのパネルのプローブで同じハイブリダイゼーションのパターンを与える。位置37がDR81+0403 ではチロシン残基であるのに対し、DR81+0408 ではセリン残基である点を除いて、DR81+0408 はDR81+0403 と同一である。上に示したプローブの例示的パネルではこの多形は検出できないが、さらに追加的なプローブを使用すれば、完全な識別が可能となる。

例6

DR3, DR5, DRw6, およびDRw8のサブタイピング

DR3, DR5, DRw6, および DRw8 の「スプリット」についてのサブタイプは、各ハロタイプの各種対立遺伝子場を識別するプローブの使用により、同定できる。たとえば、DRw17 およびDRw18 の両者は"K-30"プローブ CRX50にハイブリダイスするが、DRw17 のみが"V" プローブGH125にハイブリダイスし、これでDRw17 は、DRw18 から識別できる。同様に、DRw11 およびDRw12 対立遺伝子 (通常 DR6として分類される) は互いに、また3つのDRw8対立遺伝子から、プローブの別の組み合わせを用いて識別できる。

「一般的」血清型1~10のHCT と、同時にDR3, DR5, DRw6, および DRw8 サブタイプのHCT から、DR81特異的 PCRプライマー-CRX37/GH46で増幅した DNAを12のフィルターに適用した。これらのサンプルの血清型は既知であったから、本発明のこの態様を例示するために、これらの対立遺伝子のサブタイプの決定に必要なプローブのみを使用した。結果は図5に示す。

図5に示す結果を得るためには、約 500 ng のHCT ゲノムDNA をDR81特異的プライマー-GH46/CRX37によって増幅した。AおよびBの対のフィルターそれぞれを図5に示すプローブとハイブリダイスさせた。サンプルは、列Aでは、(1) No

DNA control; (2) DR1 HCT "KAS9003"; (3) DR2 HCT "SCHU"; (4) DRw17 HCT "QBL"; (5) DRw18 HCT "RSH"; (6) DR4 HCT "BSM"; (7) DRw11 HCT "SPOO10"; (8) DRw12 HCT "HERLUF"; (9) DRw13/DRw14 "KOSSE"; (10) DRw14 HCT "AMALA"; (11) DRw13 HCT "SLB"; 列Bは (1) No DNA control; (2) DRw13 HCT "HAQ"; (3) DR PEY "BAR P"; (4) DR7 HCT "MOU"; (5) DRw13 HCT "TAB"; (6) DRw11 HCT "ARC"; (7) DRw12 HCT "SPL"; (8) DR9 HCT "DKB"; および (9) DRw10 HCT "SHY" である。

GH56 ("YSTS") がDR3, DR5, およびDRw6にハイブリダイスし、GH102 ("YST6") がDRw6にハイブリダイスすることを示す第一パネルのプローブのデータは図7に示

す(例7参照)。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したプローブは増強化学ルミネッセンスで検出された。各サンプルにハイブリダイスするプローブのパターンを決定することにより(表8参照)、図6に示すように、サンプルは特異的な対立遺伝子に分類できる。図6には、プローブにハイブリダイスしたサンプルに+の記号を付してある。空欄は特定のプローブにハイブリダイスしなかったサンプルを示している。"KOSSE" および "BARP"を除いて、すべてのサンプルがホモ接合体細胞であった。

DR3, DR5, DRw6, および DRw8 サンプルのハイブリダイゼーションデータおよびDR型は図6に示す。サンプル"KOSSE"は血清学的にDRw6ハロタイプのホモ接合体と分類された(このサンプルはDw6 およびDw18と表示されていた)。しかしながら、それはDR81+1302 (CRX08+CRX58) およびDR81+1401 (CRX23+CRX57)と分類された。

サンプル"BARP"は血清学および MLCで DR4 Dw10 およびDRw6と分類される。したがって、"BARP"はプローブ CRX35およびCRX58 ("F-DR"および"G")にハイブリダイスし、これにより新たに発見された"DR PEY" DRw8対立遺伝子として分類され、またプローブ CRX06およびCRX57 ("I-0E"および"V")的にハイブリダイスして、DR4 Dw10対立遺伝子 (DR81+0402) の存在を反映している。

例7

細胞系のDRタイピング

確立された細胞系の多くはクラスII分子を発現しないので、それらのDR型を血清学的に判定することは不可能である。ブラインドパネルとしてコードされた6つのクラスII陽性細胞系を一般的プライマー-GH46/GH50で増幅し、第一のパネルのプローブ(表4)で調査し、サンプルの一般的血清型を確立した(図7)。

これらのおよび他の細胞系のDR型判定のためには、100 ngの細胞系DNAを一般的 HLA DRβプライマー-GH46/GH50により、30サイクルを行って増幅した。増幅された細胞系DNA(サンプルA~F)を含有する各フィルターを、一般的 HLA DRβプライマーで増幅した HCT DNAを含有する対照フィルター(サンプル1~11)と同時にハイブリダイスさせた。フィルターはすべて例1に記載のよきにして調製した。結果は図7に示す。各フィルター対は、示した SSOプローブにハイブリダイ

ズさせた。サンプルは、

(1) No DNA control; (2) DR1 HTC "KAS9003"; (3) DR2 HTC "SCHU"; (4) DR3 HTC "QBL"; (5) DR4 HTC "BSM"; (6) DR5 (DRw11) HTC "SPOOIO"; (7) DRw6 HTC "OMW"; (8) DR7 HTC "MOU"; (9) DRw8 HTC "SPACH"; (10) DR9 HTC "DKB"; (11) DRw10 HTC "SHY"; (A) No DNA control; (B) R41; (C) 616; (D) Beguit; (E) RM3; および (F) RS225 である。

CRX12 プローブのシグナル強度は、すべてのサンプルが等しく良好に増幅されたことが明らかである。R41, RM3, および RS225は、DRw10 に特異的なプローブ CRX34 にハイブリダイズする。サンプル616 は、このサンプルが DR1対立遺伝子を増幅することと矛盾しない、プローブCRX60 ("MLF") およびCRX04 ("R") にハイブリダイズする。

細胞系 Beguit は、DR7 プローブCRX49 ("G-YK") および2つの他のプローブ、GH56 ("YSTS") およびGH122 ("E") にハイブリダイズし、それは DR7およびDRw11 であることが示唆される。しかしながら、このサンプルからの推測されるDRw11 対立遺伝子はCRX35 ("F-DR")、DRB1*1101) またはCRX08 ("I-DE")、DRB1*1102) のいずれかにハイブリダイズすることが期待されたが、以下にさらに述べるように、DRw11 の新規な変異体であることが示唆される。

通常のリン/核酸塩基を有する塩基に由来するこのサンプルは、この位置における多形の性質を決定するために、クローニングし、配列を決定した。対立遺伝子の配列決定により、エピトープ "F-DE" をコードする第三の超可変領域に突然変異、配列多形のあることが示された。この対立遺伝子はDRB1*1103 として分類された (表3の配列 "Beguit" 参照)。プローブCRX68 が第三の超可変領域のこの多形に特異的にハイブリダイズする (表4参照)。

他のサンプルすべてもGH56 "YSTS" プローブにハイブリダイズし、したがって、これらは、DR3, DRw11, またはDRw6でありうる。これらの他のサンプルは "E" プローブにハイブリダイズしないので、DR3 またはDRw6の可能性もある。しかしながら、このサンプルは、3つのDRw6対立遺伝子、DRB1*1301, DRB1*1302, およびDRB1*1401 に共通に存在する配列を認識する、プローブCRX08 ("I-DE") または CRX23 ("A-H") にハイブリダイズせず、DRw6ではなくDR3 であることが示唆される。

これを調べるために、このサンプルをDRB1特異的プライマー-GH46/CRX37で増幅し、DR3, GH125 ("Y") およびCRX50 ("K-GR") について SSOで検査した。約100 ngの細胞系ゲノムDNA を、例1の記載のようにDRB1特異的プライマー-GH46/CRX37で

増幅した。増幅産物DNA を含む各フィルター (サンプルA~F) をDRB1特異的HLA DRB プライマーで増幅した HTC DNAを含有する対照フィルター (サンプル1~11) と同時にハイブリダイズさせた。フィルターはすべて例1に記載のようにして調製した。結果は図6に示す。各フィルター対は、示した SSOプローブにハイブリダイズさせた。サンプルは、

(1) No DNA control; (2) DR1 HTC "KAS9003"; (3) DR2 HTC "SCHU"; (4) DR3 HTC "QBL"; (5) DR4 HTC "BSM"; (6) DR5 (DRw11) HTC "SPOOIO"; (7) DRw6 HTC "OMW"; (8) DR7 HTC "MOU"; (9) DRw8 HTC "SPACH"; (10) DR9 HTC "DKB"; (11) DRw10 HTC "SHY"; (A) No DNA control; (B) R41; (C) 616; (D) Beguit; (E) RM3; および (F) RS225 である。

ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程後、結合したプローブは増強化学ルミネッセンスで検出された。

図6に示すように、R41, 616, RM3, およびRS225 は "Y" および "K-GR" の両者にハイブリダイズし、これはそれらをDR3 (DRw17) に分類させる。要約すると、R41, RM3, およびRS225 はDRw10/DRw17 として分類される。RM3 およびRS225 はR41に由来する細胞系であるから、それらが同じ DR3タイプを有しているも驚くべきことではない。細胞系616 はDR1/DRw17 として分類され、BeguitはDR7/DRw11 として分類されるが、上述のように、Beguit細胞系は "F-DE" エピトープを有するDRB1*1103 対立遺伝子を含む。以前には、大部分の DRw11型細胞系は、"F-DR" エピトープを有するDRB1対立遺伝子を含むことが認められていた。したがって、Beguit細胞系は DRw11型としては、異常なDRB1対立遺伝子を含む。

細胞系サンプルに加えて、3つの異なる細胞系からのDNA を増幅し、分類した。一つの細胞系は、Center for Study of Human Polymorphism (CEPH, Paris, France) からの一連の無関係なヘテロ接合体の精製ゲノムDNA である (サンプル 656~863)。他の細胞系は膀胱癌患者の癌組織のmRNAから作成したcDNAであった (サンプル2428, 2448, 2540, 2671, 2756)。正常ヒト膀胱細胞はクラスII分子を表現しないが、各種癌細胞ではクラスII分子の表現が記録されている。

残りのサンプル (PSY) は、口内癌で、DNA を精製することなく直接 HLA DRB について増幅した。完全なDRタイピングには、サンプルを一般的 DRBプライマー-GH46/50 およびDRB1特異的 PCRプライマー-GH46/CRX37の両方で増幅する。一般的プローブで増幅された DNAサンプルを含有するフィルター片を第一の/パネルのプ

ローブ (表4) で検査し、DRB1特異的に増幅した DNAサンプルを含有するフィルター片は第二の/パネルのプローブ (表5) で検査した。

表3および表8とのハイブリダイゼーションのパターンの比較により、サンプルの DRB型を明確に決定することができる。ヘテロ接合体サンプルの型判定の結果を図9に示す。図9では、プローブにハイブリダイズするサンプルは "+" の記号で示す。空欄はサンプルが特定のプローブとハイブリダイズしなかったことを指示する。

サンプル 656~863 はCEPHから提供された純粋なゲノムDNA である。サンプル "PSY" は口内癌癌から直接増幅されたサンプルである。このサンプルは 230ul の 5% Chelex 中、95°Cに5分間加熱した (Ginger-Sear; Amplifications 3: 11, 1989)。この溶液約50ul を直接、反応容量 200ul 中で増幅させて、一般的DRB およびDRB1特異的増幅反応をサンプルにつき30サイクル実施した。

サンプル2428, 2448, 2540, 2671, および2756は、膀胱癌cDNAプレパレーションから増幅した。膀胱癌サンプル2428, 2448, 2540, 2671, および2756は、SSO GH125, CRX60, CRX58, およびGH54では分析しなかった。これらのプローブは、DRB1特異的プライマー-GH46/CRX37による増幅を要求するからである。CRX37 はイントロン配列に由来するので、cDNAの増幅には使用できない。NDは測定していない。

口内癌癌サンプル、PSY はDR4w14 (DRB1*0404) およびDRw11 である。これらのデータは本システムによれば、様々な細胞系から、標準精製ゲノムDNA から、mRNAから合成されたcDNAから、異なる細胞系たとえば口内癌癌もしくは1本の毛からの、ヘテロ接合体DNA のタイピングが可能であることを示している。

例2

DRB タイピング—逆ドットブロットフォーマット

本発明のこの実施形態においては、DRBプローブは膜に固定され、増幅された標的DNA は膜結合プローブにハイブリダイズさせる。タイピングプローブのセットは、各プローブが、セット中の他のすべてのプローブと同じ濃度および塩濃度で特異的標的配列にハイブリダイズする (そして同じ洗浄条件でハイブリダイズしたままである) ように設計される。PCR Protocol と題する本 (他者として本明細書に導入する) に記載されているように、増幅に用いられる PCRプライマーは、膜に結合したプローブにハイブリダイズした増幅DNA が容易に検出できるように、

ビオチン化される。

一実施形態においては、検出は、膜結合プローブにハイブリダイズしたビオチン化、増幅DNA と、ストレプトアビシン (SA) 複合溶液でサビエルオキスターゼの反応によって行われる。すなわち、HRP はSA-ビオチン相互作用を介して増幅されたDNA に結合され、よく知られた多様な手段での発色、たとえばテトラメチルベンジジンの酸化によるたとえば着色化合物の発色 (米国特許第 4,789, 030号参照。参考として本明細書に導入する) に使用できる。

プローブは膜に任意の手段で固定できるが、好ましい方法には、長さ約13~25のオリゴヌクレオチドプローブの、はるかに長い配列ポリ-dT による「テイリング」がある。生成したポリ-dT テイルは膜上のアミノ基と反応させてプローブを膜に共有結合で固定できる。この反応は紫外線照射によって促進される。

ターミナルデオキシリボヌクレオチドシラントランスフェラーゼ (TdT, Ret11ff Biochemicals; 以下の反応には約 120単位/ul, 100 pmol/ul に相当の濃度が規定される) はプローブ上にポリ-dT テイルを創製するために使用できる。またテイルをもつプローブは、市販の DNAシンセサイザーで合成することもできる。しかしながら、DNAシンセサイザーでテイルをもつプローブを作成する場合は、主としてテイル領域に望ましくない未熟チェーンターミネーションが起こらないように、プローブの5'末端にテイルを配置すべきである。

TdT反応は1 x TdT塩、200 pmolのオリゴヌクレオチド、800 uM dTTP、および600単位の TdTを含有する約 100ul の容量で行われる。10 x TdT塩は 1000mM カコシル硫酸リウム、10 mM塩化コリット、2 mMジチオスレイトール、250mM Tris-Gl, pH 7.6であり、Rochechoudhury & Wu: Meth Enzymol, 65:43-62 の記載に従い (この記載は参考として本明細書に導入する) 製造する。8 mM dTTP の10 x 保存溶液 (NaOHで pH 7に中和) を調製するのが便利である。

TdT 反応は37°Cで2時間行い、ついで 100ul の10 mM EDTA, pH 8の添加により停止させた。テイルをつけたオリゴヌクレオチドの最終濃度は1 uM (1 pmol/ul) であり、ホモポリマーテイルの長さは約 400塩基である。テイルの長さは dTTP とオリゴヌクレオチドのモル比を調整することによって変化する。テイルをもつプローブは使用時まで-20°Cで保存できる。

逆ドットブロットフォーマットには2種類の好ましいナイロン膜がある。すな

わち BlotdyneTM ナイロン膜、孔径0.45ミクロン (Pall[®]) および BlotransTM ナイロン膜、孔径0.45ミクロン (Pall[®]) がある。ブロープは、BioRad製のドットブロット装置 Bio-DotTMを用いて、極めて簡単に膜上にスポットできる。各ブロープは膜上、独自の分離した部位にスポットする。ティールをもつブロープそれぞれ約5~10ナノモルを予め80~100 μl のTE緩衝液と混合したのち、ドットブロット装置に適用する。ドットブロット後、膜を短時間脱色し取り紙上に置いて過剰の液体を吸い取らせる。

ついで、膜を、たとえばStratagene製のStratalinkerTM 光線ボックスのような紫外線ボックスの内側に置き、出力80~80ミリジュールに露出せし、ティールをもつブロープをナイロン膜に固定化させる。簡単に洗浄して(ハイブリダイゼーション溶液中約15分) 非結合ブロープを除去し、ついで膜をバイオチン化 PCR産物のハイブリダイズさせる。PCR産物 0.5~1ピコモル(典型的な PCR産物 100μl の4分の1~2分の1) を各ブロープパネルに加えてハイブリダイズさせる。約50 μl のストレプトアビシン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(SA-HRP, R&Dから市販品)を手でできる。AmpliflypeTM DOα DNA タイピングキットの取扱マニュアル参照、参考として本明細書に導入する) 接合体をこの時点で添加するのが便利であるが、緊縮条件下の洗浄について別個にSA-HRPの最適化のインキュベーションおよび洗浄を行う方が良好なシグナルが得られる。

ハイブリダイゼーションは通常、水浴中、0.5% SDSおよび3×~6×SSPE、通常は4×からなるハイブリダイゼーション緩衝液を用いて、50℃で30分間行う。緊縮条件下の洗浄は、水浴中、0.1% SDSおよび1×SSPEからなる洗浄液を用いて、50℃で15分間行う。空温で1×SSPEによる後洗浄を30分間行うとシグナル量を増強できる。

逆ドットブロット法のためのバイオチン化プライマーおよび本発明の他の有用なプライマーは以下に示す。しかしながら、一方または両者のプライマーを増幅中にバイオチン化することもできるし、またプライマーは任意の検出フォーマットで増幅に使用してもよいことに留意すべきである。

プライマー	Seq. ID No.	配列
CRX11	SEQ ID NO: 62	5'-TCTAGAACTACTCTACCTCT-3'
CRX28	SEQ ID NO: 67	3'-CCGATCTCTCTCTCTCCGACAGGACG-3'
CRX29	SEQ ID NO: 68	3'-CTCCGCAACCCCGTATCTTCTCTGCA-3'
DRB17	SEQ ID NO: 73	3'-GAATTCCTCCGCTCCGCTCT-3'
DRB30	SEQ ID NO: 107	3'-GAATTCCTCCGCTCCGCTCTACCTT-3'
DRB152	SEQ ID NO: 228	3'-CCCGCTATCTTCTCTCTCTACAGCGG-3'
DRB159	SEQ ID NO: 95	3'-GAATTCCTCCGCTCCGCTCTACCTCTG-3'
DRB60	SEQ ID NO: 96	3'-GAATTCCTCCGCTCCGCTCTACCTCTG-3'

Bはバイオチンである。CRX11 は、DR3、DR5 およびDR6 (133および14) ハロタイプ0の第1第二エクソンを増幅するためDR50と使用するよう設計された右端プライマーである。CRX28 はバイオチン化左端プライマー-GH48、CRX29 はバイオチン化右端プライマー-GH50、DRB17 はバイオチン化右端プライマー-CRX37 である。DRB30 はCRX37 の配列を含むし、CRX37 とは異なりDRB30 はDR7 DRB1配列を増幅できる以外はCRX37 と同じDRB1断片を有する右端プライマーである。DRB152はDR7 およびDR9 対立遺伝子のための特異的右端プライマーである。DR263 および DR290はDRB1特異的増幅の範囲をDR2 およびDR9 にまで延長するように設計された両端右端プライマーである。

逆ドットブロット法に使用されるティールを付したブロープのハイブリダイゼーション領域を以下に示す。Xはイノシンである。DRB1/CRX80 のように2つのブロープ名が示されている場合は、最初の名称はティール付ブロープのハイブリダイゼーション領域(示されている)を覆し、第二の名称は HRP標識非ティールブロープを表示する。

プライマー	Seq. ID No.	配列
CRX23	SEQ ID NO: 66	3'-CCCTGCTCCGAGCACTG
GH34	SEQ ID NO: 83	3'-GCTGTTTCCAGGACTC
GH36	SEQ ID NO: 86	3'-CAGACCTAGAGTACTCC
GH39	SEQ ID NO: 87	3'-CATGTTTAACTGCTCC
GH102	SEQ ID NO: 89	3'-GAAATAACAGTCACTCCGTAG
GH104	SEQ ID NO: 90	3'-TGACATCTCCCTCTTAGGCT
GH105	SEQ ID NO: 91	3'-CTTGCAGCAGGATAAGATATG
GH111	SEQ ID NO: 91	3'-TTGAAGCAAGATAAGATTGA
GH122	SEQ ID NO: 93	3'-CACTACTCTCTCATGAGG
GH125	SEQ ID NO: 94	3'-CTGTCAGGTAACGCGAC
DRB01/CRX60	SEQ ID NO: 79	3'-CAAACTTAACTTCCAC
DRB02/CRX66	SEQ ID NO: 61	3'-CATCTCTGGAAGACGAGC
DRB03/CRX35	SEQ ID NO: 71	3'-CCTGCTTCCAGGAAAT
DRB04/CRX49	SEQ ID NO: 74	3'-TGACACTTATAGTTACC
DRB05/CRX34	SEQ ID NO: 70	3'-CTCAAACTTAACTCTCTC
DRB06/CRX04	SEQ ID NO: 60	3'-GAGCAGAGGCGGCGCC
DRB07/CRX68	SEQ ID NO: 84	3'-GACTTCTGGAAGACGGA
DRB08/CRX12	SEQ ID NO: 63	3'-AGCTGCGGCGGCGCT
DRB09/CRX30	SEQ ID NO: 75	3'-CACCGCGCGCGCTCTCT
DRB10/CRX33	SEQ ID NO: 76	3'-GAGCAGAAAGCGGCGC
DRB11/CRX15	SEQ ID NO: 64	3'-ACCTCGCGCGCGCTCTC
DRB12/CRX52	SEQ ID NO: 81	3'-ACATCTGGAAGACAGG
DRB13/CRX63	SEQ ID NO: 82	3'-ACATCTGGAAGACAGG
DRB14/CRX61	SEQ ID NO: 80	3'-CGCGCTAGGCGCGAGT
DRB15/CRX56	SEQ ID NO: 77	3'-CGGCTTCTGGAAGGCT
DRB16/CRX57	SEQ ID NO: 78	3'-CGGCTTCTGGAAGGCT
DRB19	SEQ ID NO: 97	3'-TGACACTTATAGTTACGCTC
DRB20	SEQ ID NO: 98	3'-CTCAAACTTAACTCTCTCC
DRB21	SEQ ID NO: 99	3'-GAGCAGAGCGCGGC
DRB22	SEQ ID NO: 100	3'-CCCTGCTTCCAGGAAAT

DRB23	SEQ ID NO: 101	3'-GCGCGCTCTCTCTCTC
DRB24	SEQ ID NO: 102	3'-GAGCAGAAAGCGCGCC
DRB25	SEQ ID NO: 103	3'-CATCTCTGGAAGACAGG
DRB26	SEQ ID NO: 104	3'-CATCTCTGGAAGACAGGCGG
DRB27	SEQ ID NO: 105	3'-ACATCTGGAAGACAGG
DRB28	SEQ ID NO: 107	3'-ACCTCGCGCGCTCTC
DRB31	SEQ ID NO: 108	3'-CTCCCGTTATGATGATATC
DRB32	SEQ ID NO: 109	3'-TGTCCAGGTACCGCA
DRB33	SEQ ID NO: 110	3'-ACTCTGTTTAACTCTCTCC
DRB34	SEQ ID NO: 111	3'-CTCATGTTTAACTCTCTCC
DRB35	SEQ ID NO: 112	3'-TGTCCGCGAGTCTCTG
DRB36	SEQ ID NO: 113	3'-CGCTCTCTCTCCAGGAAAT
DRB37	SEQ ID NO: 114	3'-CGCGCTCTCTCCAGGAAAT
DRB38	SEQ ID NO: 115	3'-TCCACCGCGCGCGCTCTCT
DRB39	SEQ ID NO: 116	3'-GAGCAGAAAGCGCGCC
DRB40	SEQ ID NO: 117	3'-GAGCAGAAAGCGCGCC
DRB41	SEQ ID NO: 118	3'-GGCGCGCTCTCTCTCTC
DRB42	SEQ ID NO: 119	3'-GAGCAGAGCTGCGCGCGCT
DRB43	SEQ ID NO: 120	3'-GACTCTCTGGAAGGCGAGG
DRB44	SEQ ID NO: 121	3'-GAGCCTCTCTGAGCGGAGG
DRB45	SEQ ID NO: 122	3'-GAGCGGAGGCGGCTCTCT
DRB46	SEQ ID NO: 123	3'-TCAGAGCTAGAGTACTCTC
DRB47	SEQ ID NO: 124	3'-TCTTCTGAGCAGGATAAGATATG
DRB48	SEQ ID NO: 125	3'-CACTCATGTTTAACTCTCTCC
DRB49	SEQ ID NO: 126	3'-TCAGACTTACGAGCTCTC
DRB50	SEQ ID NO: 127	3'-TCAGACTTAACTCTCTCTC
DRB51	SEQ ID NO: 128	3'-GAGCAGAAAGCGGAGG
DRB52	SEQ ID NO: 129	3'-GAGCAGAAAGCGGAGG
DRB53	SEQ ID NO: 130	3'-GCGCGCGCTCTCTCTCTC
DRB54	SEQ ID NO: 131	3'-CGCGCGCGCTCTCTCTCTC
DRB55	SEQ ID NO: 132	3'-GAGCAGAAAGCGGAGG
DRB56	SEQ ID NO: 133	3'-GAGCAGAAAGCGGAGG
DRB57	SEQ ID NO: 134	3'-CCAGCGCGCGCGCGCTCTCT
DRB58	SEQ ID NO: 135	3'-CATCTCTGGAAGACAGGCGG
DRB59	SEQ ID NO: 136	3'-CATCTCTGGAAGACAGGCGG
DRB60	SEQ ID NO: 137	3'-GCGCGCGCTAGCGCGGAGT
DRB61	SEQ ID NO: 138	3'-ACCTCTCTGGAAGCGGAGG

附表6-505625 (15)

DRB62 SEQ ID NO: 139 S 5'-GAGTCTCTGAGCCGAG
DRB63 SEQ ID NO: 140 S 5'-CATCTCTGAGCCGAG
DRB64 SEQ ID NO: 141 U 5'-ACCTCGGCCCCTCTG
DRB65 SEQ ID NO: 142 U 5'-GAGCAGAAAGCCG
DRB67 SEQ ID NO: 143 U 5'-GAGXAGAAAGCCG
DRB68 SEQ ID NO: 144 U 5'-CTCTGCGCCCTCTG
DRB69 SEQ ID NO: 145 U 5'-CTCTCTGAGCCGAG
DRB70 SEQ ID NO: 146 S 5'-CGCTCTCTTCCAGGATG
DRB71 SEQ ID NO: 147 U 5'-TTCTTGCACCCAGATAAATATG
DRB72 SEQ ID NO: 148 S 5'-CGCTCTCTCTCCAGGATG
DRB73 SEQ ID NO: 149 U 5'-AGAAAGCCGCGCCGCTG
DRB74 SEQ ID NO: 150 U 5'-GAGCAGAGCCGCGCC
DRB75 SEQ ID NO: 151 U 5'-GAGCAGAGCCGCGCC
DRB76 SEQ ID NO: 152 U 5'-CTCTCTCTCCAGGAGG
DRB77 SEQ ID NO: 153 U 5'-CTCTCTGAGCCAGAAAG
DRB78 SEQ ID NO: 154 U 5'-CTCTCTGAGCCAGAAAG
DRB79 SEQ ID NO: 155 U 5'-CTCTCTGAGCCAGAAAG
DRB80 SEQ ID NO: 156 U 5'-CGCCGCGCCCTCTG
DRB81 SEQ ID NO: 157 U 5'-CGCCGCGCTCTGAGAGCT
DRB82 SEQ ID NO: 158 U 5'-CTCTCTCTCCAGGAGGTC
DRB83 SEQ ID NO: 159 U 5'-ACCTCTCTGAGCCAGAAAG
DRB84 SEQ ID NO: 160 S 5'-GCGCCGCGCTCTGCTC
DRB85 SEQ ID NO: 161 U 5'-GCGCCGCGCTCTGCTC
DRB86 SEQ ID NO: 162 U 5'-GCGCCGCGCTCTGCTC
DRB87 SEQ ID NO: 163 U 5'-GAGCCGCGCCGAGGT
DRB88 SEQ ID NO: 164 U 5'-GAGCCGCGCCGAGGTG
DRB89 SEQ ID NO: 165 U 5'-GAGCCGCGCCGAGGTGGA
DRB90 SEQ ID NO: 166 S 5'-AGAAAGCCGCGCCGCG
DRB91 SEQ ID NO: 167 S 5'-AGAAAGCCGCGCCGCG
DRB92 SEQ ID NO: 168 U 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB93 SEQ ID NO: 169 U 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB94 SEQ ID NO: 170 U 5'-ACCTCGGCGCCCTC
DRB95 SEQ ID NO: 171 S 5'-CATCTCTGAGCCAGAGG
DRB96 SEQ ID NO: 172 U 5'-GAGCAGAAAGCCAGG
DRB97 SEQ ID NO: 173 U 5'-GCGCGCGCTAGCCGCGAGTAC
DRB98 SEQ ID NO: 174 U 5'-GTAGGAGCTTCTGTCCG
DRB99 SEQ ID NO: 175 U 5'-GTAGGAGCTTCTGTCCG

DRB100 SEQ ID NO: 176 S 5'-TTCTTGCAGCAGATAGTATGAG
DRB101 SEQ ID NO: 177 S 5'-CTCCCTTTTATGATATATC
DRB102 SEQ ID NO: 178 S 5'-CACTACTCTCATCAGGC
DRB103 SEQ ID NO: 179 S 5'-CTTCTCAAGTACCGCA
DRB104 SEQ ID NO: 180 U 5'-ACCTCGGCGCCCTCT
DRB105 SEQ ID NO: 181 U 5'-GAGGCGCGCCGAGGTGAGC
DRB106 SEQ ID NO: 182 U 5'-AGAGCGCGCCGAGGTGAGC
DRB107 SEQ ID NO: 183 S 5'-AGAAAGCCGCGCCG
DRB108 SEQ ID NO: 184 S 5'-GAAAGCCGCGCCG
DRB109 SEQ ID NO: 185 S 5'-GAAAGCAGCCGCGCCCTG
DRB110 SEQ ID NO: 186 U 5'-GCTCTGCTTCCAGGAACTCC
DRB111 SEQ ID NO: 187 U 5'-CTCAGACGTAGACTACTCC
DRB112 SEQ ID NO: 188 S 5'-GCTCTCTGCGAGCACTG
DRB113 SEQ ID NO: 189 S 5'-GAGCTCTGAGAGCAGG
DRB114 SEQ ID NO: 190 U 5'-CTCTCTCTCCAGGAGGTG
DRB115 SEQ ID NO: 191 U 5'-ACCGGCTTGTGAGAGCTT
DRB116 SEQ ID NO: 192 U 5'-ACCGGCTTGTGAGAGCTT
DRB117 SEQ ID NO: 193 U 5'-ACCGGCTTGTGAGAGCTT
DRB118 SEQ ID NO: 194 S 5'-GAGCGCGCCGAGGTG
DRB119 SEQ ID NO: 195 U 5'-GAGCGCGCCGAGGTG
DRB120 SEQ ID NO: 196 U 5'-GAGCGCGCCGAGGTG
DRB121 SEQ ID NO: 197 U 5'-GAGCGCGCCGAGGTG
DRB122 SEQ ID NO: 198 U 5'-GAGCGCGCCGAGGTG
DRB123 SEQ ID NO: 199 T 5'-GCGCGCTAGCGCGAGTA
DRB124 SEQ ID NO: 200 T 5'-CCACGCGCCGCTCTCT
DRB125 SEQ ID NO: 201 T 5'-GAGCGCGCCGCGGT
DRB126 SEQ ID NO: 202 T 5'-ACCGCGCCGCGCTCT
DRB127 SEQ ID NO: 203 T 5'-GAGCGCGCCGCGGT
DRB128 SEQ ID NO: 204 T 5'-ACCGCGCGCCGCTCT
DRB129 SEQ ID NO: 205 T 5'-ACTTCTGAGAGCAGG
DRB130 SEQ ID NO: 206 T 5'-GCGCAAGCTCTCTCTG
DRB131 SEQ ID NO: 207 T 5'-CAAGAGGAGAGCTTCCG
DRB132 SEQ ID NO: 208 T 5'-GAGAGCAGCGCGCCCTG
DRB133 SEQ ID NO: 209 T 5'-AAGAGCAGCGCGCCCTG
DRB134 SEQ ID NO: 210 T 5'-ACTTCTGAGAGCAGG
DRB135 SEQ ID NO: 211 T 5'-ACTTCTGAGAGCAGG
DRB136 SEQ ID NO: 212 T 5'-ACATCTGAGAGCAGG

DRB137 SEQ ID NO: 213 T 5'-GCTCTCTTCCAGGATG
DRB138 SEQ ID NO: 214 T 5'-GAGAGAGCGCGCCG
DRB139 SEQ ID NO: 215 T 5'-CGCGCGCCGCTTCTG
DRB140 SEQ ID NO: 216 T 5'-GAGAGAGCGCGCGCG
DRB141 SEQ ID NO: 217 T 5'-CGCGCGCCGCTCTG
DRB142 SEQ ID NO: 218 T 5'-GAGAGAGCGCGCGCG
DRB143 SEQ ID NO: 219 T 5'-CTCGCGCCGCTCTG
DRB144 SEQ ID NO: 220 T 5'-GCGAGAGCGCGCGCG
DRB145 SEQ ID NO: 221 T 5'-CTCGCGCGCCGCTCTG
DRB146 SEQ ID NO: 222 T 5'-CTCGCGCCGCTCTG
DRB147 SEQ ID NO: 223 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB148 SEQ ID NO: 224 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB149 SEQ ID NO: 225 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB150 SEQ ID NO: 226 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB151 SEQ ID NO: 227 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB152 SEQ ID NO: 228 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB153 SEQ ID NO: 229 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB154 SEQ ID NO: 230 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB155 SEQ ID NO: 231 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB156 SEQ ID NO: 232 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB157 SEQ ID NO: 233 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB158 SEQ ID NO: 234 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB159 SEQ ID NO: 235 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB160 SEQ ID NO: 236 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB161 SEQ ID NO: 237 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB162 SEQ ID NO: 238 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB163 SEQ ID NO: 239 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB164 SEQ ID NO: 240 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB165 SEQ ID NO: 241 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB166 SEQ ID NO: 242 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB167 SEQ ID NO: 243 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB168 SEQ ID NO: 244 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB169 SEQ ID NO: 245 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB170 SEQ ID NO: 246 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB171 SEQ ID NO: 247 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB172 SEQ ID NO: 248 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB173 SEQ ID NO: 249 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB174 SEQ ID NO: 250 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT
DRB175 SEQ ID NO: 251 T 5'-GCGGCTTGTGAGAGCT

DRB176 SEQ ID NO: 252 S 5'-GCGGCGCCGCTCTG
DRB177 SEQ ID NO: 253 S 5'-CGCGCGCCGCTCTG
DRB178 SEQ ID NO: 254 S 5'-GCGGCGCCGCTCTG
DRB179 SEQ ID NO: 255 S 5'-CGCGCGCCGCTCTG
DRB180 SEQ ID NO: 256 S 5'-XGCGGCTGAGAGAGCT
DRB181 SEQ ID NO: 257 S 5'-XGCGGCTGAGAGAGCT
DRB182 SEQ ID NO: 258 S 5'-CTACCGGCTGAGAGAG
DRB183 SEQ ID NO: 259 S 5'-CTACCGGCTGAGAGAG
DRB184 SEQ ID NO: 260 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB185 SEQ ID NO: 261 S 5'-GCGGCGCGGTGAG
DRB186 SEQ ID NO: 262 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB187 SEQ ID NO: 263 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB188 SEQ ID NO: 264 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB189 SEQ ID NO: 265 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB190 SEQ ID NO: 266 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB191 SEQ ID NO: 267 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB192 SEQ ID NO: 268 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB193 SEQ ID NO: 269 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB194 SEQ ID NO: 270 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB195 SEQ ID NO: 271 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB196 SEQ ID NO: 272 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB197 SEQ ID NO: 273 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB198 SEQ ID NO: 274 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB199 SEQ ID NO: 275 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB200 SEQ ID NO: 276 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB201 SEQ ID NO: 277 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB202 SEQ ID NO: 278 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB203 SEQ ID NO: 279 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB204 SEQ ID NO: 280 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB205 SEQ ID NO: 281 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB206 SEQ ID NO: 282 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB207 SEQ ID NO: 283 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB208 SEQ ID NO: 284 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB209 SEQ ID NO: 285 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB210 SEQ ID NO: 286 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB211 SEQ ID NO: 287 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC
DRB212 SEQ ID NO: 288 S 5'-GTTCCGCGCGGTGAC

ープは20アミノ酸28に特異的であり、プローブ22はアミノ酸57〜60に特異的である。対照プローブはアミノ酸61〜68に特異的である。

上記パネルに示したプローブは単離して、例7に記載の DRBタイピング方法に使用できることに留意すべきである。同じハイブリダイゼーションおよび洗浄条件が使用される。

キットは2つの箱にパッケージされた。一つの箱には DRB試薬を、他の箱には DRB1試薬を充填した。各箱にパッケージされたものは、DRBまたはDRB1 PCRミックス、DNAコントロール、およびタイピングストリップ；8 mM塩化マグネシウム溶液；鉱油；SA-HRP接合体；発色原 (TMB)；反応緩衝液；ならびに指示書であった。PCR は塩化マグネシウムおよび/またはTMBを除くPCR に必要な試薬を含有する。記載の方法の実施に必要な他の試薬および装置はキットユーザーによって供給され、すべて一般に市販されていた。

PCR 増幅に使用するのに適したサンプルの調製操作はいくつか、本技術分野において既知である。好ましい操作は、Singer-Searl Amplification 3:11, 1989, および Yajima's BioTechniques 10(4): 606-613, 1991 に記載された（両記載とも参考として本明細書に導入する）Chelex 抽出法である。生物学的サンプルから核酸を抽出する他の技術の例には、Sambrook's Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Arrand: Preparation of Nucleic Acids Probes, pp 18-30, in Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (Haves & Higgins 編, IRL Press, 1985); または PCR in Protocols, 18-20 (Innis 編, Academic Press, 1990) の記載がある。すべて参考として本明細書に導入する。

すべての DRB配列を増幅するためおよびDRB1配列を増幅するためのプライマー対は、2つの別個の PCR反応に使用される。増幅反応は Saiki 氏: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230-6234, 1989 の記載（参考として本明細書に導入する）にほぼ従い、以下のように改良して行う。

反応は総容積 100 μ l 中サンプル25 μ l を用いて実施する。各反応は、50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 10 μ M のセラチン、各 200 μ M の dATP, dCTP, dGTP および dTTP, 0.2 μ M の各ヒトゲン化増幅プライマー、ならびに *Thermus aquaticus* DNA ポリメラーゼ (Pfu) を含有させる。

で、旋回速度は約50rpm で5分間インキュベートし、ウエルを再び吸引する。

ストリップを含む各ウエルに、3mlの洗浄/酵素接合溶液 (3.3mlの洗浄液と、使用の15分以内に調製した酵素接合体27 μ l の溶液から) を加える。トレーを室温で、旋回速度は約50rpm で20分間インキュベートする。各ウエルから溶液を吸引し、ストリップを10mlの洗浄液中、室温、旋回速度は約50rpm で5分間洗浄する。最後に、洗浄液を各ウエルから吸引し、ついでストリップを発色工程に移す。

発色工程は DRBおよびDRB1の両者について同じである。各ウエルに10mlのグエン酸緩衝液 (100mMグエン酸ナトリウム, pH 5.0) を加え、トレーを約50rpm の旋回速度機上に置く。好ましくは発色溶液はこの間に調製する（使用前10分以内）。各ウエルの発色溶液は、10mlのグエン酸緩衝液、10 μ l の3%過酸化水素、および0.5ml [TMB] 色原溶液 (Pfu) から市販されている) を緩やかに（渦を起ささない）混合する。トレーを旋回速度機からはずし、グエン酸緩衝液を吸引し、新たに作成した発色溶液10mlを各ウエルに前える。トレーは、発色工程の始めから、アルミホイルのカバーを用いて遮光する。ストリップは、室温、旋回速度は約50rpm で30分まで発色させる。所望のシグナル強度が得られたならば直ちに、発色工程は終結させることができる。

所望のシグナル強度が達成されたならば、トレーを旋回速度機からはずし、各ウエルの内容を吸引する。各ウエル内に10mlの脱イオン水で洗浄して発色を停止させる。水を加え、トレーを室温、約50rpm の旋回速度機上で5分間洗浄し、各ウエルの内容を徐々に逆さ出す。少なくとも3回洗浄しなければならない。

ストリップは、タイピングトレー中に逆光して、2°C〜8°Cで2〜3日間保存できる。ストリップは湿気時に永久保存用に撮影する。ストリップは、わずかに発色はするが、乾燥して箱所に保存することもできる。結果は、DNA プローブストリップ上の青色のドットのパターンを読み取り解釈する。それぞれの青色ドットは、ヒトゲン化増幅生成物が固定化プローブとハイブリダイズしたことを意味する。すべての DRB対立遺伝子を検出する内部対照プローブ (DRB42) は、ストリップ上の他の陽性ドットの強度と同等もしくはそれより弱い強度のドットを産生するように設計する。これは、陽性と評価すべき最低のドット強度を示す。

上記キットのプローブは、31のDRB1タイプを識別する。これらのプローブで

増幅反応には同一の温度プロフィールを使用し、前反応を同じサーモサイクラー中で同時に行うことが可能にする。サーモサイクラーは、以下の温度プロフィール、すなわち86°Cで60秒間変性、60°Cで30秒間アニーリング、72°Cで80秒間延伸の35サイクルにプログラムする。サーモサイクラーは、最後のサイクルに続いて72°Cでさらに7分間サンプルをインキュベートするようにプログラムする。

PCR からの増幅DNA は二重鎖で、オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズするように変性されなければならない。増幅DNA はサーモサイクラー中95°Cで5〜10分間変性し、その温度に使用時まで保持する。別法として、変性した増幅DNA を95°Cの温度から直接氷浴に移すことができる。急速な冷却は、DNA を変性型で安定化する。増幅DNA は、ハイブリダイゼーションが行われるまで、氷浴中に保持する。

2個のナイロン膜ストリップのそれぞれに12個のプローブを付着させる。一方のストリップは DRB増幅産物とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含有し、他のストリップはDRB1特異的増幅産物とのハイブリダイゼーションに使用されるプローブを含有する。ハイブリダイゼーション反応は、それぞれのプローブ含有ストリップを別個のウエル中に保持するトレー中で行われる。ハイブリダイゼーショントレーはPfu) から市販されている。通常、キットで供給される。以下に記載するハイブリダイゼーション条件は DRBハイブリダイゼーションに特異的である。DRB1 DNAハイブリダイゼーションプロトコルは DRBプロトコルとは、DRB1ハイブリダイゼーションが50°Cではなく55°Cで行われる点で異なる。プロトコルの他の点はすべて同一である。

ストリップを含む各ウエルは、予め加熱したハイブリダイゼーション溶液 (4 \times SSPEおよび0.5% Tween 20/容積 SDS) 3 ml, ついで25 μ l の増幅DNA を加える。トレーの内容を注意深く混合した後、トレーを50°Cの恒温水浴中に入れ50°C、約80rpm で20分間インキュベートする。

ストリップは最初、室温条件下での洗浄の前に洗浄液 (1.0 \times SSPEおよび0.1% Tween 20/容積 SDS) 10 ml 中、室温で数秒間洗浄し、各ウエルを吸引する。室温洗浄の温度および時間にはとくに制限はない。予め加熱した洗浄液 (10 ml) を各ウエルに加え、トレーを、50°Cの恒温水浴中約80rpm で12(±2)分間インキュベートする。各ウエルを吸引したのち、各ウエルに10mlの洗浄液を加え、トレーを室温

維持されるタイプの一部が関連対立遺伝子のセットである。図10には、1990対立遺伝子セットのプローブハイブリダイゼーションパターンを示す。図11, 12, および13には、各プローブハイブリダイゼーションパターンの可能な判定を提示する。ストリップの結果は、図11〜13を直接用いて容易に判定できる。

結果の簡便な判定操作はまた、プローブハイブリダイゼーションパターンを入力すると、すでに入力されている既知の対立遺伝子のパターンと照合させて、可能な判定を提供するコンピュータプログラムによって行うこともできる。プローブハイブリダイゼーションパターンを可能性のある対立遺伝子の組み合わせと照合させるのに適当なアルゴリズムには、単純なテーブルルックアップおよび判定トリアルアルゴリズムが含まれる。プログラム入力は手操作によっても、また青色のハイブリダイゼーションドットの強度を検出する自動ストリップリーダーによってもよい。

上述のように、この対立遺伝子プロットタイピングによっても、可能なすべてのタイプを完全に識別はできない。たとえば、このシステムは DRB血清型の細分類はできない。ある種のヘテロ接合体の組み合わせも完全には分割できない。これらはすべて、以下の例12に説明するように、対立遺伝子特異的増幅およびプローブのための別のプライマー対によって解決できる。

プライマー対DRB28 およびDRB29 のハイブリダイゼーション位置のため、このプライマー対で増幅した場合、位置88に存在するアミノ酸変異は許すつてできない。したがって、位置88のみが異なる対立遺伝子は識別できない。位置88におけるグリシンおよびバリンのみが異なる対立遺伝子は7対が知られている。これらの対立遺伝子を以下に掲げる。

位置88のみが異なる対立遺伝子対

DRB1*1501 and DRB1*1502
DRB1*0302 and DRB1*0303
DRB1*0403 and DRB1*0407
DRB1*0404 and DRB1*0408
DRB1*1101 and DRB1*1104
DRB1*1301 and DRB1*1302
DRB1*0802 and DRB1*0804

例10

一般DR81タイプシグナル増幅器

例4には、DR81対立遺伝子のタイプシグナルの略略を記載した。ここには、別の概略を記載する。DR81対立遺伝子におけるすべての45+対立遺伝子の完全な識別を達成するためには、2段階増幅が使用される。第1段階は、全サンプルの DR81一般プライマー、GMBおよびGMB1による増幅である。得られた PCR産物を固定化し、どの対立遺伝子特異的増幅を実施する必要があるかおよび第2の段階でスクリーニングすべき増幅型を決定するために、第1パネルのプロープで検査する (例4と同様に)。増幅およびハイブリダイゼーションプロトコールは例4と同様である。対立遺伝子特異性を参照したハイブリダイゼーションパターンの判定は、各プロープパネルについて行われる。

第1段階タイプシグナル

プロープの第1のパネルは、表4に示したプロープパネルと、2、3のプロープが異なるだけで、類似している。以下のプロープパネルに示す対立遺伝子特異性中、対立遺伝子記号の最後の文字としてのXは、特定された番号で始まるすべての対立遺伝子が認識されることを指示する。たとえば、030Xは、0301、0302 および0303と同一である。

HLA DR81 タイピング SSOプロープの第1のパネル

プロープ	SEQ ID NO:	エピトープ	対立遺伝子	濃度 (SSPE, %)
CRX33	SEQ ID NO: 69	"W-L-F"	010X	0.4X, 42
GR106	SEQ ID NO: 90	"W-P-R"	130X, 160X	0.2X, 42
GR136	SEQ ID NO: 86	"Y-S-T-S"	030X, 110X, 130X, 1401, 1402	0.2X, 42
GR139	SEQ ID NO: 87	"V-L-F"	040X	0.2X, 42, 20
CRX49	SEQ ID NO: 74	"G-Y-K"	070X	1.0X, 42
GR102	SEQ ID NO: 89	"Y-S-T-G"	080X, 120X, 1404	0.1X, 42
GR111	SEQ ID NO: 92	"K-D-F"	0901	0.4X, 42
CRX134	SEQ ID NO: 70	"E-V"	1001	0.4X, 42
GR127	SEQ ID NO: 93	"E"	110X	0.3X, 42
CRX61	SEQ ID NO: 80	"S"	0403, 0409, 0410, 0411, 0801, 0803, 1304, 1305	0.1X, 42
CRX13	SEQ ID NO: 66	"A-H"	1401, 1404	0.1X, 42
CRX06	SEQ ID NO: 61	"T-D-R"	0103, 0402, 1102, 1301, 1302, 1304	0.1X, 42
CRX35	SEQ ID NO: 71	"T-D-R"	1601, 1101, 1104, 1303, 0801, 0802, 0804, 1202	0.2X, 42
CRX68	SEQ ID NO: 84	"T-D-R"	1103	0.2X, 42
CRX62	SEQ ID NO: 81	"T-D-X"	1303	0.2X, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB * 全 "	全	0.2X, 42

プロープをハイブリダイズし、ついで、42℃で20分間洗浄するGR88を除き、42℃で15分間洗浄する。SSPE溶液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プロープは、5'末端で HRPに接合させる。第1のプロープパネルから得られたハイブリダイゼーションパターンに基づいて、サブタイプシグナルこうしては対立遺伝子特異的増幅が必要になる。

DR7, DR9, およびDR10の各タイプは同定できる唯一の対立遺伝子ではなく、第1段階のプロープパネルから直接同定できる。実際、DR7 タイプを特定する対立遺伝子には、DRB1*0701 およびDRB1*0702 がある。しかしながら、これらの2つの対立遺伝子は第3のエクソンのみで異なり、第2のエクソンからの配列を増幅および検出する本方法では識別できない。したがって、本発明の方法では唯一の明確な対立遺伝子が同定できる。

第2段階タイプシグナル

DR2

すべてのタイプが血清学的に DR2である、W-P-R (GR104) に対する陽性シグナルを含有するサンプルは、W-P-Rエピトープを有する対立遺伝子に特異的なプライマー対、A883およびA880で増幅される。得られた生成物は以下のパネルで検査される。

HLA DR2 タイピング SSOプロープ

プロープ	SEQ ID NO:	エピトープ	対立遺伝子	濃度 (SSPE, %)
DR883	SEQ ID NO: 149	"A"	130X	0.1X, 42
DR813	SEQ ID NO: 189	"D-R"	1602	0.1X, 42 or 0.4X, 50
CRX33	SEQ ID NO: 71	"P-D-R"	1601	0.2X, 42
CRX57	SEQ ID NO: 78	"V"	1501, 1502	0.2X, 42
CRX56	SEQ ID NO: 77	"Q"	1102, 160X	0.2X, 42
DR8136	SEQ ID NO: 272	"H (D)"	1503	1.0X, 42
DR8197	SEQ ID NO: 273	"T (D)"	1501, 1502, 160X	1.0X, 42
GR104	SEQ ID NO: 90	"W-P-R"	DR2	0.2X, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB * 全 "	全	0.2X, 42

示されたプロープは、ハイブリダイズし、ついで42℃で15分間洗浄する。SSPE溶液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プロープは、5'末端で HRPに接合させる。

DR3, DR5, DR6

プロープGR88のエピトープYSTSに対する陽性シグナルを含有するサンプルは、DR3, DR5, またはDR6のいずれかである。これらの対立遺伝子は、A882およびA880で特異的に増幅される。これらの対立遺伝子は、以下のプロープパネルを用いて識別できる。

HLA DR3, 5, 6 タイピング SSOプロープ

プロープ	SEQ ID NO:	エピトープ	対立遺伝子	濃度 (SSPE, %)
CRX59	SEQ ID NO: 75	KDR	030X	0.2X, 50
GR125	SEQ ID NO: 94	Y	0301	0.2X, 50
DR8180	SEQ ID NO: 256	A	030X, 1301, 1302, 1301, 1402, 1403, 1401	0.2X, 42
GR122	SEQ ID NO: 93	E	118X	0.2X, 42
CRX61	SEQ ID NO: 80	S	1303, 1304	0.2X, 42
CRX23	SEQ ID NO: 64	A-H	1401	0.1X, 42
CRX06	SEQ ID NO: 61	I-DE	1102, 1301-02	0.2X, 42
CRX62	SEQ ID NO: 81	I-Q-K	1303	0.2X, 42
CRX68	SEQ ID NO: 84	F-D-E	1103	0.2X, 42
CRX35	SEQ ID NO: 71	F-D-R	1101, 1104, 1303	0.2X, 42
CRX04	SEQ ID NO: 65	K	1402	0.1X, 42
CRX37	SEQ ID NO: 78	V	0301, 0303, 1162, 1104, 1301, 1304, 1303, 1403	0.2X, 42
CRX56	SEQ ID NO: 77	Q	0302, 1101, 1302, 1303, 1305, 1402, 1403	0.2X, 42
GR136	SEQ ID NO: 86	Y-S-T-S	DR3, DR5, DR6	0.2X, 42
CRX12	SEQ ID NO: 63	DRB * 全 "	全	0.2X, 42

示されたプロープは、ハイブリダイズし、ついで42℃で15分間洗浄する。SSPE溶液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プロープは、5'末端で HRPに接合させる。

DR4

プロープGR88でYHエピトープに対する陽性シグナルを含有するサンプルは、DR4である。これらの対立遺伝子は、A884およびA880で特異的に増幅される。これらの対立遺伝子は、以下のプロープパネルを用いて識別できる。

特表平6-505625 (10)

プローブ	エピトープ	対立遺伝子	濃度
CRX61	S	0405, 0409, 0410, 0411	0.1X, 42
CRX64	K	0401, 0409	2X, 40
CRX04	R	0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	0.1X, 42
CRX15	R-E	0403, 0405, 0407, 0411	0.4X, 55
CRX08	DE	0402	
CRX37	V	0402, 0403, 0404, 0405, 0410, 0411	0.2X, 42
CRX56	D	0401, 0405, 0407, 0408, 0409	0.2X, 42
OH59	V-H	DR4	0.2X, 42
CRX12	DRB" 全 "	全	0.2X, 42

示されたプローブは、ハイブリダイスし、ついで42℃で15分間洗浄する。ただし、GH59の場合は例外で、42℃で20分間洗浄する。SSPE洗浄液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プローブは、5'末端で HRPに接合させる。

例1, ORx8, および OR12

プローブCRX33 でRLF エピトープに対する陽性シグナルまたはプローブRH102 でYST8エピトープに対する陽性シグナルを含有するサンプルは DRB1 特異的プライマー-DRH8およびCRX37 で増幅される。これは、DR2, DR7, およびDR9 を除くすべてのDRB1対立遺伝子も増幅する。対立遺伝子は、ついで、以下に示すプローブパネルを用いて識別できる。

プローブ	エピトープ	対立遺伝子	濃度 (SSPE, °C)
CRX33	WLF	010X	0.4X, 42
CRX04	R	0101, 0102, 0403, 0404, 0405, 0406, 0407, 0408, 0410, 0411	0.1X, 42
CRX06	DE	0103, 1101, 1301, 1302	0.2X, 42
CRX37	V	0301, 0402, 0403, 0404, 0405, 0410, 0411, 1102, 1103, 1104, 1301, 1304, 1401, 1404, 1403, 0804	0.2X, 42
DRB181	AV	0102, 1201, 1202	0.1X, 42
CRX35	G	0101, 0103, 0303, 0401, 0405, 0407, 0408, 0409, 1101, 1302, 1303, 0801, 0802, 0803, 1305, 1402, 1403	0.2X, 42
GH102	YST8	0801, 0802, 0803, 0804, 1201, 1202, 1404	0.1X, 42
GH54	V-S	1201, 1202	0.4X, 42
CRX63	F-DR	1201, 0803	0.2X, 42
CRX35	F-DR	0801, 0802, 1202, 1101, 1104, 1305	0.2X, 42
CRX12	DRB" 全 "	全	0.2X, 42

示されたプローブは、ハイブリダイスし、ついで42℃で15分間洗浄する。SSPE洗浄液はすべて 0.1% SDS を含有する。各プローブは、5'末端で HRPに接合させる。

プローブによって認識されるエピトープの一部は多くの対立遺伝子によって共有されるので (たとえばDR9, 上記プローブパネルとのハイブリダイゼーションパターンから得られる結果は、プローブがDR1, ORx8, もしくはDR12 に属するが、またはDRB1特異的プライマーで同様に増幅される他の対立遺伝子が属する) を決定するために、ほかの対立遺伝子特異的増幅と比較される。RLF およびYST8エピトープはタイピングの結果の判定を単純化する。

例11

ヘテロ接合体の対立遺伝子サブタイピング

例10のプローブパネルとのハイブリダイゼーションパターン単独では、ある種のヘテロ接合体に存在する対立遺伝子の明確な決定には不十分である。プロ

ブハイブリダイゼーションパターンは、サンプル中にどの対立遺伝子エピトープが存在するかを示す。存在する特異的対立遺伝子を決定するには、どのエピトープがどの対立遺伝子に存在するかを知る必要がある。通常、エピトープ起源は、対立遺伝子の組み合わせの可能性に限定があるので、推測可能で、このような不明瞭はほとんど起こらない。起こることがある場合には対立遺伝子特異的増幅を用いて解決される。

DR5/OR8ヘテロ接合体では、以下のプローブパターンが起り得る。

プローブ	GH54	GH122	DRB181	CRX04	CRX31	CRX54	CRX37
エピトープ	YTS	S	DA	S-DE	F-DR	G	V

3つの異なるDR5/OR8ヘテロ接合対立遺伝子の組み合わせが、このプローブハイブリダイゼーションパターンを生じる。これらの組み合わせを以下に掲げる。これらのヘテロ接合対立遺伝子の組み合わせは他のプローブでは識別できない。

DRB1*1101 および DRB1*1301
DRB1*1104 および DRB1*1302
DRB1*1102 および DRB1*1305

これらの可能性を識別するためには、位置88における独特の二形性を利用する他のプライマーが設計された。DRB1対立遺伝子はすべて、位置88にバリンまたはグリシンを含有する。上に掲げた各ヘテロ接合体では、一方の対立遺伝子は位置88にバリンを、他方はグリシンを含有する。DRB1*1301, DRB1*1104, および DRB1*1102はそれぞれ位置88にバリンを、DRB1*1101, DRB1*1302, および DRB1*1305はそれぞれグリシンを含有する。VまたはG特異的プライマーを群特異的プライマー (N-PR, VH, またはYST8) と組み合わせる用いた増幅では、位置88における多形に基いた単一対立遺伝子の増幅が可能になる。この方法で、各ヘテロ接合体に存在する2つの対立遺伝子の一方を選択的に増幅することが可能で、直接プローブハイブリダイゼーションによって決定できる。第二の対立遺伝子は、可能な対立遺伝子の組み合わせに基づく第一の対立遺伝子の知識から推定できる。

単一对立遺伝子増幅によるDR5/OR8ヘテロ接合体のサブタイピングは、PCRプライマー対A882/RAP05およびA882/RAP08を用いて達成された。増幅は、PCR緩衝液に最終濃度1.0mM MgCl₂ を添加したほかは例10と同様に実施した。サーモサイクラーは35サイクルにプログラムした。温度プロフィールは、94℃にランズ、94

℃で30秒間変性、30秒間アニーリング、および70℃で延長とした。プローブハイブリダイゼーションは前述の通り行った。V-特異的 (RAP08) およびG-特異的 (RAP05) プライマーは以下に、また配列掲載部に示す。それぞれA882と組み合わせ使用したが、他の群特異的プライマーも適当である。

プライマー	SEQ ID NO:	性質	配列
RAP05	SEQ ID NO: 312	G (86)	5'-CGCTGCAGTGTGTAAGCTCTACCA
RAP08	SEQ ID NO: 313	V (86)	5'-CGCTGCAGTGTGTAAGCTCTACCA

例12

DRB2段階タイピングキット

ここに記載されるキットは、可能な限り多数のタイプを効率的に同定するために設計されたものである。プライマーおよびプローブは、逆ドットブロットフォーマットにおいて、DRB1およびDRB3遺伝子座の迅速な、しかしながら完全なタイピングを提供するために設計される。DRB1遺伝子座における全46対立遺伝子およびDRB3遺伝子座の3個の対立遺伝子の完全な識別を達成するために、2段階決定を使用する。第一段階は、全サンプルの DRB1-群プライマー、DRB27 (SEQ ID NO: 105) およびDRB28 (SEQ ID NO: 108) による増幅である。得られた PCR産物をT3プローブのストリップに対してスクリーニングし、これで対立遺伝子特異的増幅、および第二段階のスクリーニングが必要か否かが決定される。

増幅およびハイブリダイゼーションは例9と同様に行う。DRB1-群の増幅産物は、DRB1遺伝子座の第一可変領域に特異的な8つのプローブ、3つのDRB3遺伝子座 (82a, 82b, 82c) に特異的な4つのプローブ、および1つのコントロールプローブを含有するプローブパネルに対してスクリーニングする。3つの対立遺伝子を得る。DR2ハロタイプに見出されるDRB5遺伝子座をタイピングするため、このストリップにさらにもう1つのプローブを付加することもできる。認識される特異的ハイブリダイゼーション領域およびタイプを以下に掲げる。

増殖されるタイプ	増殖配列
1 DR1	WLF
2 DR2	WPR
3 DR3, 5, 6	YSTS
4 DR4	VH
5 DR7	OYK
6 DR8, 12	YSTG
7 DR9	KDF
8 DR10	SV
9 52a	LRS
10 52b, 52c	LRS
11 52b	設計中
12 52c	設計中
13 52	TELGRR

DR83タイプはこの検定の結果から決定され、この検定の結果に基づいて、どちらの対立遺伝子特異的増殖(ASA)を行う必要があるかを決定する。サンプルのタイプピングに最も必要なものは2つであるが、5つの異なるASAを提示する。同じ3'プライマー、AB60はたとえば、すべての5つのASAに代えて使用でき、通常、キット中に加えられる成分に包含される。5'プライマーによって、増殖特性が付与される。各5'プライマーによって増殖される DR8タイプおよび図解されるエピソードを以下に挙げる。プライマー2、3および4が設計され、広範囲に試験され、上記実施例で説明した。

増殖されるタイプ	ハイブリダイゼーション配列
DR1	WLF
DR2	WPR
DR3, 5, 6	YSTS
DR4	VH
DR8, 12	YSTG

第二段階は、ASAからの増殖産物の5つのタイプピングを可能にする一連のプロンプに歸する。一実施形態においては、すべてのプロンプを単一のストリップに付着させ、この単一のストリップを ASAからの生成物のタイプピングに使用する。以下の領域に特異的なプロンプが ASAの結果のタイプピングに十分である。

DR1-0133 (SEQ ID NO: 17): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT CAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-0804 (SEQ ID NO: 22): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT AAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-1105 (SEQ ID NO: 39): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT AAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-1202 (SEQ ID NO: 33): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT AAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-1304 (SEQ ID NO: 35): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT AAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

領域 エピソード

57-60 DAE, S, E, A-H, V-S

67-74 R, I-DE, I-A, F-DR, DR, KUZ, K, R-B/RR-B, F-DR, I-DK, I-DR, DR-L

85-86 G, V, AV

その他

U (a.a. 20), H (a.a. 30), Y (a.a. 26), S (a.a. 37)

「その他」の領域の多形は白人の間では極めて稀である。しかしながら、本発明の重要な目的は非白人集団のタイプピングも可能にすることである。これらの位置における他のプロンプを、ヘテロ接合体対ホモ接合体の識別における不明瞭性の解決のために、包含させることもできる。

表9

1989対立遺伝子セットに含まれない対立遺伝子

DR1-0303 (SEQ ID NO: 61): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT CAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-0403 (SEQ ID NO: 13): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT CAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-0410 (SEQ ID NO: 15): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT CAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-1403 (SEQ ID NO: 38): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT CAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-1403 (SEQ ID NO: 41): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT CAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

DR1-1501 (SEQ ID NO: 44): CA GTT TTC TTT GAG CAG GTT AAA CAT GAG
TGT CAT TTC TTC AAC GCG ACC GAG CGG GTG CGG TTC GTT GAG AGA TAC TTC
TAT CAC CAA GAG GAG TCA GTT CGC TTC CAT AGC GAC GTT GCG GAG TAC CGG
GCG GTT ACC GAG GTG GCG CGG CTT AGC GCG GAG TAC TGG AAC AGC CAG AAC
GAC CTC GTG GAG TTT AGC CGG CGG GAG GTT GAG ACC TAC TGG AGA CAG AAC
TAC CGT GTT GTT GAG AAC TTC ACA GTT CAG CGG CGA

FIG. 1

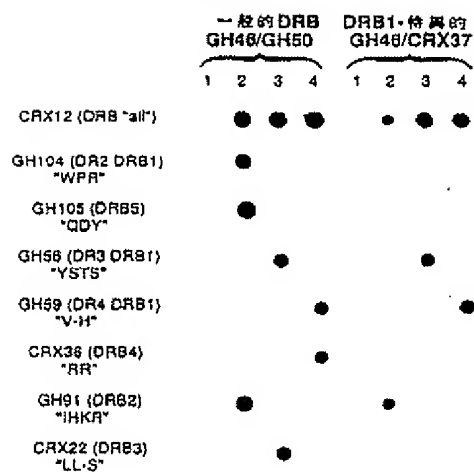


FIG. 2

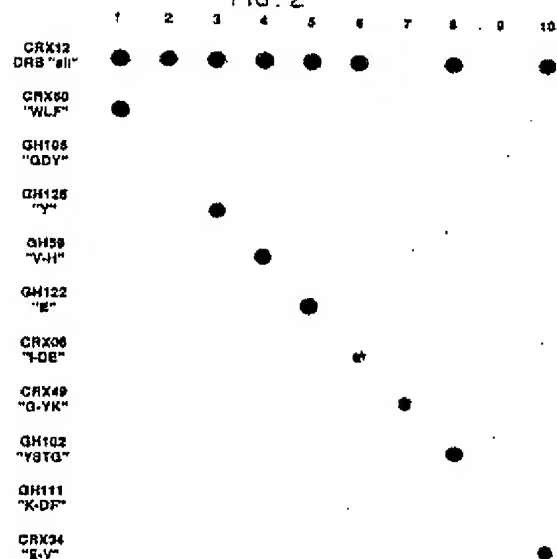


FIG. 3

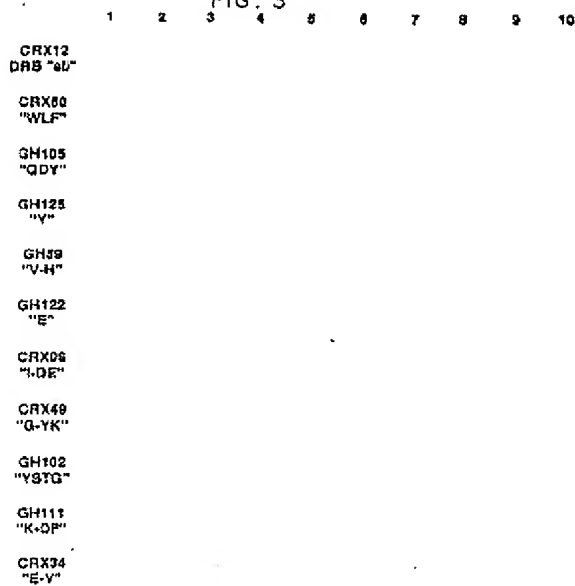
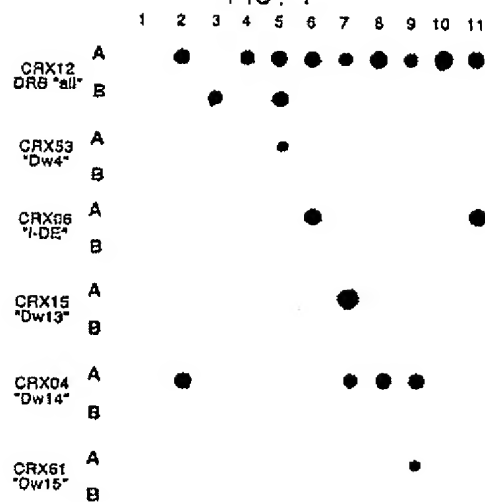


FIG. 4



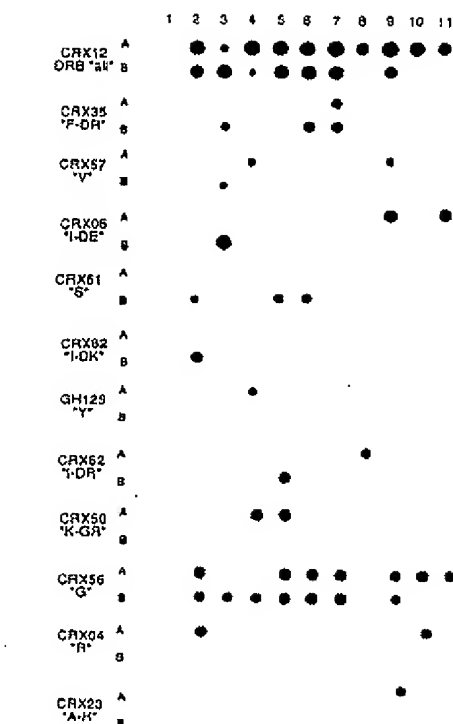


FIG. 5

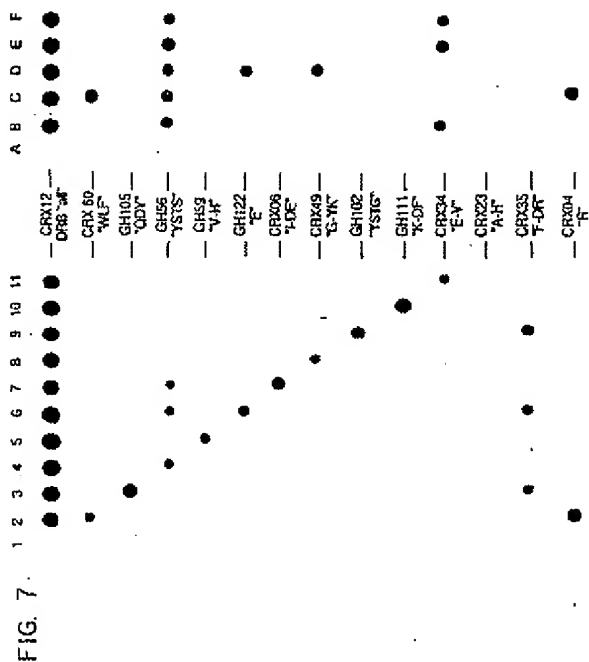


FIG. 7

Gene	CRX12	CRX35	CRX57	CRX06	CRX61	CRX82	GH129	CRX62	CRX50	CRX56	CRX04	CRX23
CRX12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GH129	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CRX23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

FIG. 6

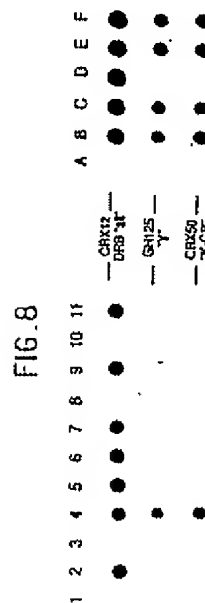


FIG. 8

00001 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1

ORBIT 94789-7

[illegible]

ACT/US 91/00296

[illegible]

International Appendix 10a

PCT/US 91/09204

ALL DOCUMENTS CONTAINED HEREIN TO BE RELEASED		CONTINUED FROM E.O. 13526 (SECRET)	
Category 1	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Reference to Other File	
A	<p>EP, A, O 237 862 (CETUS CORP) 16 September 1987 cited in the application</p> <p>see page 43, line 2 - line 6</p>	<p>5, 7, 10, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 26-29</p>	

国際調査報告

US 910922P1
SA 85459

This document contains the patent family members relating to the patent document cited in the above-mentioned international search report. The members are not intended to be the European Patent Office EPO file. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 07/04/92

Patent document cited in international report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8911547	50-11-89	AU-A- 3690889	18-12-89
		EP-A- 0437160	23-03-91
		JP-T- 3504326	26-03-91
WO-A-8901875	01-06-89	EP-A- 0438458	07-08-91
EP-A-0237362	16-09-87	AU-B- 594113	01-03-90
		AU-A- 5988287	17-09-87
		EP-A- 0459512	04-12-91
		EP-A- 0459833	04-12-91
		JP-A- 62214355	21-09-87

For more details about this patent, see Official Journal of the European Patent Office, No. 14/92

フロントページの続き

- (72)発明者 ブガウン, テオドリカ
アメリカ合衆国94579 カリフォルニア州
サン リードンロ, ファリス ストリート
15524
- (72)発明者 グリフィス, ロバート エル.
アメリカ合衆国94002 カリフォルニア州
ベルモント, オーク クノール ドライブ
1820

- (72)発明者 シャーフ, スチーブン ジェイ.
アメリカ合衆国94709 カリフォルニア州
パークレー, フランシスコ ストリート
2028-1 / 2
- (72)発明者 アップル, レイモンド ジェイ.
アメリカ合衆国94116 カリフォルニア州
サン フランシスコ, トウェンティーセカ
ンド アベニュー 2622

